Pest Management Regulatory Agency
Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire

Regulatory Note

REG2004-05

Ophiostoma piliferum Strain D97

Sylvanex Technical (TGAI)
Sylvanex (EP)

The microbial active ingredient *Ophiostoma piliferum* strain D97 (SYLVANEX TECHNICAL) and the associated end-use product SYLVANEX have been granted temporary registration under Section 17 of the Pest Control Products (PCP) Regulations for use as a biological antisapstain product to control blue-staining fungi on freshly felled lodgepole pine and red pine logs at the felling site.

This Regulatory Note provides a summary of the data reviewed and the rationale for the regulatory decision regarding these products.

(publié aussi en français)

30 March 2004

This document is published by the Alternative Strategies and Regulatory Affairs Division, Pest Management Regulatory Agency. For further information, please contact:

Publications Coordinator
Pest Management Regulatory Agency
Health Canada
2720 Riverside Drive
A.L. 6605C
Ottawa, Ontario
K1A 0K9

Internet: pmra_publications@hc-sc.gc.ca
www.hc-sc.gc.ca/pmra-arla/
Information Service:
1-800-267-6315 or (613) 736-3799
Facsimile: (613) 736-3798

ISBN: 0-662-36737-5 (0-662-36738-3)
Catalogue number: H113-7/2004-5E (H113-7/2004-5E-PDF)

© Her Majesty the Queen in Right of Canada, represented by the Minister of Public Works and Government Services Canada 2004

All rights reserved. No part of this information (publication or product) may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical photocopying, recording or otherwise, or stored in a retrieval system, without prior written permission of the Minister of Public Works and Government Services Canada, Ottawa, Ontario K1A 0S5.

Foreword

The submissions for the registration of the technical grade active ingredient *Ophiostoma piliferum* strain D97 SYLVANEX TECHNICAL and its end-use product SYLVANEX for control of blue-staining fungi on freshly felled lodgepole pine and red pine logs at the felling site, produced by AgraSol Inc., have been reviewed by Health Canada's Pest Management Regulatory Agency (PMRA).

SYLVANEX is a microbial antisapstain product, containing 76% (w/w) *Ophiostoma piliferum* strain D97, intended for the control of blue-staining fungi on freshly felled lodgepole pine and red pine logs at the felling site. The active microorganism, *Ophiostoma piliferum* strain D97, is a naturally occurring fungus and is not currently registered in the United States for use as an antisapstain product. There is no antisapstain product currently registered for Sylvanex's proposed use pattern.

AgraSol Inc. will be carrying out additional studies as a condition of this temporary registration. Following the review of this information, the PMRA will publish a proposed regulatory decision document and request comments from interested parties before proceeding with a final regulatory decision.

Table of Contents

1.0 The active substance, its properties and uses 1
- 1.1 Identity of the active substance and impurities 1
- 1.2 Physical and chemical properties of active substances and end-use product(s) 2
- 1.3 Details of uses and further information 3

2.0 Methods of analysis 5
- 2.1 Methods for analysis of the active substance as manufactured 5
  - 2.1.1 Methods for identification of the microorganism 5
  - 2.1.2 Methods for establishment of purity of seed stock 5
  - 2.1.3 Methods to define the content of the microorganism in the manufactured material used for the production of formulated products .. 6
  - 2.1.4 Methods for the determination of relevant impurities in the manufactured material 7
  - 2.1.5 Methods to show absence of any human and mammalian pathogens 7
  - 2.1.6 Methods to determine storage stability, shelf-life of the microorganism 8
- 2.2 Method for formulation analysis 8

3.0 Impact on human and animal health 8
- 3.1 Integrated toxicity and infectivity summary 8
- 3.2 Hypersensitivity incidence 9
- 3.3 Impact on human and animal health arising from exposure to the active substance or to its impurities 9
  - 3.3.1 Occupational and bystander exposure assessment 9

4.0 Residues 10
- 4.1 Residue summary 10

5.0 Fate and behaviour in the environment 10

6.0 Effects on non-target species 11
- 6.1 Integrated environmental toxicology summary 11

7.0 Efficacy 12
7.1 Effectiveness 12
7.1.1 Intended use 12
7.1.2 Mode of action 12
7.1.3 Nature of the pest problem 12
7.1.4 Effectiveness against pests 13
7.2 Phytotoxicity to target plants (including different cultivars), or to target plant products (OECD 7.4) 16
7.3 Observations on undesirable or unintended side effects 16
7.4 Economics 16
7.5 Sustainability 17
7.5.1 Survey of alternatives 17
7.5.2 Compatibility with current management practices including integrated pest management 17
7.5.3 Contribution to risk reduction 17
7.5.4 Information on the occurrence or possible occurrence of the development of resistance 17
7.6 Conclusions 17

8.0 Toxic Substances Management Policy considerations 19

9.0 Regulatory decision 19

List of abbreviations 21

Appendix I Toxicology 23
Table 1 Summary of toxicity and infectivity studies with *Ophiostoma piliferum* Strain C-1 det 5 23

Appendix II Environmental assessment 25
Table 1 Risks of *Ophiostoma piliferum* strain D97 to non-target terrestrial organisms 25
Table 2 Risks of *Ophiostoma piliferum* strain D97 to non-target aquatic organisms 26

References 29

1.0 The active substance, its properties and uses

1.1 Identity of the active substance and impurities

TGAI Identitification

Active microorganism	*Ophiostoma piliferum* strain D97
Function	Biological antisapstain
Binomial name	*Ophiostoma piliferum*
Taxonomic designation	
Kingdom:	Eumycota
Phylum:	Dikaryomycota
Subphylum:	Ascomycotina
Class:	Ascomycetes
Order:	Ophiostomatales
Family:	Ophiostomataceae
Genus:	*Ophiostoma*
Species:	*piliferum*
Strain:	WZ5803D97 (abbreviated as D97)
Canadian patent status information	A patent (Canadian Patent Application Number 2009622) was issued on 30 November 1999 under the former Cartapip 97 trade name for reducing the pitch content in wood pulp. Cartapip 97 has also been applied for patent status as a biological control for wood products and debarking (Canadian Patent Application Number 2149808) and as a fungus for pitch reduction (Canadian Patent Application Number 2047900).
Nominal purity of active	Sylvanex Technical (TGAI) consists of 57% active ingredient and 1.5% spent fermentation medium corresponding to 20–50 activity units (AU)/kg [where 1 AU is defined as 1×10^{12} colony forming units (CFU) of *Ophiostoma piliferum* strain D97]. 76% w/w (equivalent to 30–50 AU/kg) in Sylvanex (end-use product [EP]).

Identity of relevant impurities of toxicological, environmental and/or other significance	The technical product does not contain any impurities or microcontaminants known to be TSMP Track 1 substances. Production cultures are tested for albinism and microbial growth prior to being used as inoculum. The final product is analyzed for microbial contamination (*Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, total coliforms, fecal coliforms, yeast and mould count, fecal streptococci). Batches that surpass the established limits with respect to microbial contaminants must be destroyed. No mammalian toxins are known to be produced by strain D97.

1.2 Physical and chemical properties of active substances and end-use product(s)

Technical product: Sylvanex technical

Property	Result
Physical state	suspension
pH in distilled water	6–7
Density	1000 kg/m^3
Viscosity	400 cps

End-use product: Sylvanex

Property	Result
Colour	tan brown
Physical state	flake
Guarantee	76% w/w (equivalent to 30–50 AU/kg)
Formulants	All formulants in Sylvanex are considered relatively non-toxic (i.e., are on either USEPA inerts list 4A or 4B). The product does not contain any USEPA List 1 formulants or formulants known to be TSMP Track 1 substances.
Density	180 kg/m^3
pH in distilled water	6–7

Property	Result
Corrosion character	not irritating to skin; mildly irritating to eyes
Wettability	readily suspended if vortexed
Moisture content	1-3%

1.3 Details of uses and further information

Sylvanex is a wettable powder EP containing the active ingredient *Ophiostoma piliferum* strain D97 proposed for use as a biological antisapstain product on freshly felled lodgepole pine and red pine logs at the felling site only. Sylvanex is to be diluted in water and applied during harvesting of the wood using a hydraulic spray system that is attached to the harvesting equipment. There is no antisapstain product currently registered for this proposed use pattern.

Ophiostoma piliferum has been isolated in Europe, Australia, the United States and Canada. In the United States, *Ophiostoma piliferum* is widespread on coniferous lumber (Hunt, 1956) and it is reported as one of the most important of the staining fungi in the southern states (Verrall, 1939). In Canada, *Ophiostoma piliferum* is indigenous to a number of ecozones. *Ophiostoma piliferum* has been found on logs and/or lumber from lodgepole pine, white spruce, jack pine and black spruce in British Columbia, Alberta, Saskatchewan, Ontario and Quebec (Uzunovic et al., 1999).

Ophiostoma piliferum is a saprophytic primary colonizer of fresh sapwood in cut trees and lumber. The fungus colonizes only dead woody materials and has a preference for softwoods over hardwoods. Wild-type pigmented strains of the fungus cause discolouration of sapwood.

Ophiostoma piliferum strain D97 was derived from matings of wild-type strains of *Ophiostoma piliferum* (Figure 1.3.1), including the faded grey wild-type C-1 strain of *Ophiostoma piliferum*. Homokaryotic strains were obtained from strain C-1 by single-spore ascospore isolation. The ascospores were allowed to germinate resulting in individual hyphal colonies, which were visually screened. A white or colourless isolate, C-1 det 84, was selected for further matings.

Darkly pigmented (black) strains such as TAB51 and TAB28 are associated with rapid colonization and are used in crosses with colourless strains in order to produce offspring that are both colourless and fast-growing. C-1 det 84 was subsequently crossed with the pigmented wild-type strain, TAB51. From the resulting colonies, Cartapip 58 was selected for further mating based on its colourless and growth properties.

Identity of relevant impurities of toxicological, environmental and/or other significance	The technical product does not contain any impurities or microcontaminants known to be TSMP Track 1 substances. Production cultures are tested for albinism and microbial growth prior to being used as inoculum. The final product is analyzed for microbial contamination (*Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, total coliforms, fecal coliforms, yeast and mould count, fecal streptococci). Batches that surpass the established limits with respect to microbial contaminants must be destroyed. No mammalian toxins are known to be produced by strain D97.

1.2 Physical and chemical properties of active substances and end-use product(s)

Technical product: Sylvanex technical

Property	Result
Physical state	suspension
pH in distilled water	6–7
Density	1000 kg/m^3
Viscosity	400 cps

End-use product: Sylvanex

Property	Result
Colour	tan brown
Physical state	flake
Guarantee	76% w/w (equivalent to 30–50 AU/kg)
Formulants	All formulants in Sylvanex are considered relatively non-toxic (i.e., are on either USEPA inerts list 4A or 4B). The product does not contain any USEPA List 1 formulants or formulants known to be TSMP Track 1 substances.
Density	180 kg/m^3
pH in distilled water	6–7

Property	Result
Corrosion character	not irritating to skin; mildly irritating to eyes
Wettability	readily suspended if vortexed
Moisture content	1-3%

1.3 Details of uses and further information

Sylvanex is a wettable powder EP containing the active ingredient *Ophiostoma piliferum* strain D97 proposed for use as a biological antisapstain product on freshly felled lodgepole pine and red pine logs at the felling site only. Sylvanex is to be diluted in water and applied during harvesting of the wood using a hydraulic spray system that is attached to the harvesting equipment. There is no antisapstain product currently registered for this proposed use pattern.

Ophiostoma piliferum has been isolated in Europe, Australia, the United States and Canada. In the United States, *Ophiostoma piliferum* is widespread on coniferous lumber (Hunt, 1956) and it is reported as one of the most important of the staining fungi in the southern states (Verrall, 1939). In Canada, *Ophiostoma piliferum* is indigenous to a number of ecozones. *Ophiostoma piliferum* has been found on logs and/or lumber from lodgepole pine, white spruce, jack pine and black spruce in British Columbia, Alberta, Saskatchewan, Ontario and Quebec (Uzunovic et al., 1999).

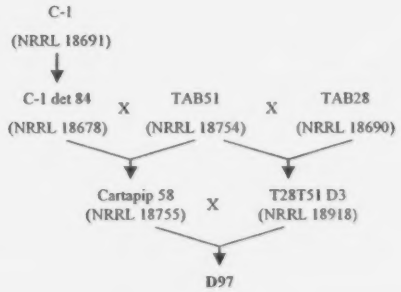
Ophiostoma piliferum is a saprophytic primary colonizer of fresh sapwood in cut trees and lumber. The fungus colonizes only dead woody materials and has a preference for softwoods over hardwoods. Wild-type pigmented strains of the fungus cause discolouration of sapwood.

Ophiostoma piliferum strain D97 was derived from matings of wild-type strains of *Ophiostoma piliferum* (Figure 1.3.1), including the faded grey wild-type C-1 strain of *Ophiostoma piliferum*. Homokaryotic strains were obtained from strain C-1 by single-spore ascospore isolation. The ascospores were allowed to germinate resulting in individual hyphal colonies, which were visually screened. A white or colourless isolate, C-1 det 84, was selected for further matings.

Darkly pigmented (black) strains such as TAB51 and TAB28 are associated with rapid colonization and are used in crosses with colourless strains in order to produce offspring that are both colourless and fast-growing. C-1 det 84 was subsequently crossed with the pigmented wild-type strain, TAB51. From the resulting colonies, Cartapip 58 was selected for further mating based on its colourless and growth properties.

In a similar manner, a light brown variant, T28T51 D3, was a single ascospore isolate resulting from a cross of the two wild-type strains, TAB28 and TAB51. A final cross between T28T51 D3 and Cartapip 58 yielded the single ascospore colourless D97 strain used in Sylvanex. The D97 strain was selected as the active ingredient for Sylvanex based on its growth on woods such as pine, its white or colourless characteristics and its ability to degrade pitch.

Figure 1.3.1 Family tree for *Ophiostoma piliferum* strain D97



Ophiostoma piliferum strain D97 differs from most other strains of this species in that it lacks melanin within its fungal cell walls, thus inferring a colourless quality. Sylvanex is to be used to control blue-staining fungi and prevent sapstain. The white or colourless strain in Sylvanex competes with pigmented fungi for limited food and nutrient sources in freshly felled wood. The natural level of blue-staining fungi cannot colonize and outgrow the high concentration of the albino strain that is applied.

C-1 det 5, another colourless single ascospore isolate of *Ophiostoma piliferum* strain C-1, was used in all human health and safety studies, while Cartapip 58 was the test substance in most environmental toxicology studies. Since there is no indication that there are subspecies or varieties within this species, C-1 det 5, Cartapip 58 and Cartapip 97 can be considered biologically equivalent.

This control agent has previously been assessed in 1998 by Environment Canada and Health Canada and found acceptable for non-pesticidal use as a woodchip pitch control agent for the pulp and paper industry (New Substance Notification, NSN #6858).

2.0 Methods of analysis

2.1 Methods for analysis of the active substance as manufactured

2.1.1 Methods for identification of the microorganism

Ophiostoma species can be differentiated from closely related organisms in the genus *Ceratocystis* based on morphology (e.g., ascocarps, hyphae, conidiophores). Sensitivity to the antibiotic cycloheximide can also distinguish between *Ceratocystis* and *Ophiostoma*. While linear growth of *Ophiostoma piliferum* was observed on malt extract agar amended with cycloheximide at concentrations of up to 1000 ppm, none of the *Ceratocystis* species grew on malt extract agar with >50 ppm cycloheximide (Harrington, 1981).

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns generated by *Hae*III DNA-restriction digestion of the 26S rRNA gene can be used to distinguish *Ophiostoma piliferum* from other sapstain *Ophiostoma* species.

Amplification of the β-*tubulin* gene with a specially designed primer pair (Cat1–Cat2), differentiates *Ophiostoma piliferum* strain D97 from most other *Ophiostoma piliferum* strains. Strain D97, in addition to strains from Quebec, Saskatchewan and the United States, yield a characteristic 180 base pair DNA fragment while strains from Europe, New Zealand, British Columbia and Alberta fail to yield this fragment. The use of an original archival seed culture for all production batches of Sylvanex along with other identifying properties of the D97 strain (e.g., colourlessness) alleviates concerns associated with differentiation of the D97 strain from natural or wild-type strains of *Ophiostoma piliferum*.

2.1.2 Methods for establishment of purity of seed stock

The master seed stock of *Ophiostoma piliferum* strain D97 used in production of Sylvanex is stored in vials at -70°C, in AgraSol's laboratory in Raleigh, North Carolina and is also deposited in the United States Department of Agriculture's (USDA) Northern Regional Research Laboratory (NRRL) culture collection (NRRL No. 18917).

Production vials are prepared by aseptically inoculating a 250 mL shake flask containing 100 mL yeast malt extract (20 g/L malt extract, 2 g/L yeast extract) with 1 mL of frozen *Ophiostoma piliferum* strain D97 stock. The flask is then incubated on a shaker set at 120 rpm and 28°C for 24 hours. The contents of the shake flask are then transferred to a 2 L flask containing 900 mL of yeast malt extract and incubated on the shaker once again for 24–48 hours. The incubation is stopped when sporulation occurs, as determined by light microscopy. When grown in this manner, the fermentation product consists of 60–70% blastospores.

Sterilized glycerol is added to the fermentation product to a final concentration of 20% v/v and the mixture is aseptically transferred to sterile 1 mL cryopreservation vials that are stored at -70°C. Each batch of production vials is assigned a code for the purposes of tracking during inoculum quality assurance (QA) and production.

Production cultures are tested for albinism and microbial growth prior to being used as inoculum for production of Sylvanex. To test for albinism, samples from at least two vials are diluted and plated on potato dextrose agar (PDA) and incubated at 28°C for 96 hours. The batch of production vials pass the albinism test only if no pigmented colonies are observed among 1000 plated colonies. No other test for the integrity and consistency of the strain is employed.

To test for unintended microbes, a sample of at least 10^8 colony forming units (CFU) of *Ophiostoma piliferum* strain D97 are plated onto PDA or Luria agar. The plates are incubated at 37°C, which is non-permissive for growth of *Ophiostoma piliferum*. After 24, 48, 72 and 96 hours, the plates are examined for the presence of bacterial, fungal or yeast colonies. The batch of production vials pass the unintended microbes test if no colonies are observed on any of the PDA or Luria agar plates.

2.1.3 Methods to define the content of the microorganism in the manufactured material used for the production of formulated products

The viability of the intermediate spore slurry is assayed using one of two methods. The first method uses a specialized spiral plate dispenser that distributes 50 µL of diluted sample (four dilutions) on the surface of a rotating 10 cm PDA plate from the centre to the edge in decreasing amount, such that the volume of sample on any portion of the plate is known. The plates are incubated at 32°C for 60–65 hours and then the total counts are determined. Each plate yields three total plate count readings. The resulting 12 total plate count readings are averaged to determine the final count. Alternatively, a standard spread plate method may be employed. Dilutions of the slurry are plated onto PDA, in replicates of five plates per dilution, and incubated upside down at 25°C for three to four days. Only plates with 25–200 colonies are included in the count determination. The intermediate slurry is acceptable if the cell count by plate assay is at least 5×10^9 CFU/g. The intermediate slurry is generally near $2x10^{10}$ CFU/g.

After drying, the viability of the product is once again checked using the standard spread plate method. The sample is prepared by hydrating 5 g Sylvanex in 100 mL of water at 25°C and pH 5–6 with 30 minutes of shaking or stirring. Five replicates of the hydrated Sylvanex are prepared. The hydrated Sylvanex is serially diluted and 100 µL of each dilution (typically the 10^5, 10^6, 10^7 and 10^8 dilutions) is plated onto a PDA plate. The plates are incubated upside down at 25°C for three to four days. Plates with 25–200 colonies are enumerated and the results are expressed as CFU/mL and activity units (AU)/kg. One activity unit is defined as being equivalent to 10^{12} CFU. The potency data suggest that the range can be further limited to 30–50 AU/kg. The nature of the manufacturing process may result in a wide potency range among various batches. The

applicant proposes to provide the consumer with the total number of AUs per shipping carton along with the net weight of each carton. The user can then calculate the AU/kg for the contents of each shipping carton and determine the amount of product to be applied. This proposal is acceptable. A new product specification form indicating the limits imposed on the guarantee are required for the EP.

2.1.4 Methods for the determination of relevant impurities in the manufactured material

Plates from Sylvanex potency assays are incubated for an additional 6–7 days to ensure that none of the colonies are pigmented.

Assays for salmonellae, *Staphylococcus aureus*, total coliforms, fecal coliforms, yeasts and moulds as well as fecal streptococci were performed according to recognized guidelines (AOAC, USFDA, American Public Health Association). Quality control data from five batches of Sylvanex were provided. All batches tested negative for salmonellae (/10 g) and *Staphylococcus aureus* (/1g). The highest count of any class of unintended microorganisms tested was the fecal streptococci count in one batch of 1.15×10^4 CFU/g, but this was below the established limit of 10^5 CFU/g established for other microbial pesticide products. The total coliform counts for two batches ranged from 2.2 to 6.6×10^3 CFU/g exceeded the limit of 10^3 CFU/g set for other microbial pesticide products. Representative fecal coliform colonies isolated from these two batches were identified as *Enterobacter* sp., *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae*. Screening for microbial contaminants must continue for all production batches of Sylvanex and any batches that surpass the established limits with respect to microbial contaminants must be destroyed.

Sylvanex is manufactured in a facility that also produces a number of other *Bacillus* products, primarily *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) products. Btk is a registered microbial pest control agent (MPCA) that is highly specific for lepidopteran pests. Btk poses minimal risk to humans or other animals. A potential exists, in the manufacturing plant, for contamination of the Sylvanex product with Btk spores. The applicant claims that the expected residual range for Btk spores in Sylvanex will not exceed 10^3 CFU/g.

Ophiostoma piliferum is not known to produce mammalian toxins. Lack of mammalian toxicity is supported by the lack of reports of adverse effects in humans or animals despite the ubiquitous nature of *Ophiostoma piliferum* in a number of ecozones in Canada.

2.1.5 Methods to show absence of any human and mammalian pathogens

As discussed in Section 2.1.4, the quality assurance program for the production of Sylvanex must include the destruction of batches that exceed the established limits for certain microbial contaminants.

2.1.6 Methods to determine storage stability, shelf-life of the microorganism

The stability of the product was determined at various timepoints after storage at -20°C using the standard spread plate method for viability testing described in Section 2.1.3. The storage stability data submitted for Sylvanex were of limited value since the manufacturing and testing were conducted by a number of different facilities and because only two lots were tested over time. It was unclear whether the variability in retained activity was due to the nature of the assay, the location the lot was manufactured, the testing facility (in some cases, the initial activity was assayed by one facility and the re-assay was conducted by a second facility), or differences in stability among different lots. Based on the limited data, a storage period of up to 18 months at -20°C may be supported. Reference to storage at room temperature for a few weeks must be removed from the label. Additional storage stability data will be required to amend the label to include higher storage temperatures. Such data must include lots that are analyzed intermittently over a suitable period of time on batches stored under expected operational conditions (e.g., 25°C). Other storage temperatures should also be considered. In order to minimize variability, a homogenization step should be included in the protocol for determining potency.

2.2 Method for formulation analysis

Sylvanex is not intended for food or feed use and, therefore, the establishment of a Maximum Residue Limit (MRL) is not required for *Ophiostoma piliferum* strain D97. Consequently, no method(s) to quantify *Ophiostoma piliferum* strain D97 residues in food and feed are required.

3.0 Impact on human and animal health

See Appendix I, Table 1, for summary table.

3.1 Integrated toxicity and infectivity summary

The information and data submitted by AgraSol Inc. in support of registration of *Ophiostoma piliferum* strain D97 and Sylvanex, were reviewed from the viewpoint of human health and safety and were determined to be sufficiently complete to permit a decision on registration. The information provided to address the characterization of the active ingredient as well as the manufacturing process and quality control adequately addressed the potential human health and safety concerns associated with *Ophiostoma piliferum* strain D97 and bacterial/fungal contaminants introduced during production.

The acute toxicity and infectivity studies submitted in support of registration of *Ophiostoma piliferum* strain D97 (Sylvanex Technical) and Sylvanex were reviewed. The data set comprised studies conducted on a closely related strain C-1 det 5 (see Section 1.3), and included acceptable acute oral and pulmonary toxicity/pathogenicity studies, a supplemental dermal toxicity/pathology study, which contained sufficient data to make a decision on primary dermal irritation, as well as a supplemental eye irritation study.

No signs of toxicity or pathogenicity were noted when the *Ophiostoma piliferum* strain C-1 det 5 was administered to rats via the oral or intratracheal routes. *Ophiostoma piliferum* strain C-1 det 5 was not irritating when applied dermally to rabbits, but toxicity results were equivocal because the guideline dose requirements for dermal toxicity testing were not met. Because of this uncertainty, standard personal protective equipment (PPE) to guard against dermal exposure will be required, and a new dermal toxicity study using the EP at the required dose will be required to complete the health and safety assessment. Slight conjunctival redness was observed after administration of *Ophiostoma piliferum* strain C-1 det 5 to the eyes of rabbits. The irritation potential of Sylvanex is expected to be greater than that of the test substance used due to the physical properties of its powder formulation. Standard label statements will be required to mitigate the risk to eyes. *Ophiostoma piliferum* has not been reported to produce any mammalian toxins. A database search yielded no evidence of mammalian toxin production. This finding was confirmed in a letter of expert opinion from a researcher in the field of ophiostomatoid fungi who, after extensively reviewing the literature on *Ophiostoma piliferum* and its metabolites, stated that he knew of no toxins or antibiotics produced by *Ophiostoma piliferum*.

3.2 Hypersensitivity incidence

The Canadian pulp and paper industry has used Sylvanex since 1995 as a pitch reducing agent. There have been no reported incidents of hypersensitivity associated with manufacturing, formulating, or applying Sylvanex for this purpose. However, in common with all microorganisms, *Ophiostoma piliferum* is considered to be a potential sensitizing agent.

3.3 Impact on human and animal health arising from exposure to the active substance or to its impurities

3.3.1 Occupational and bystander exposure assessment

The review of human health and safety studies showed that Sylvanex (*Ophiostoma piliferum* strain D97) is of low acute toxicity, and is not pathogenic by oral gavage and intratracheal instillation. Like all microbial pesticides, *Ophiostoma piliferum* is considered to be a potential sensitizer, though there were no reports of hypersensitivity. An acute eye irritation study showed that *Ophiostoma piliferum* was minimally irritating to the eyes as a suspension, though its potential for irritation as a powder is unknown.

Furthermore, this product has been used as a pitch control agent in the pulp and paper industry since 1995. No human health or safety concerns have been raised since that time.

The proposed use for *Ophiostoma piliferum* strain D97 is as an antisapstain product on freshly felled lodgepole pine and red pine logs to be applied as a spray at a rate of 10^{11} CFU (100–300 g) per m^3 using a sprayer attached to the cutting apparatus of the feller–buncher, delimber, or harvester machines. Occupational exposure could occur during mixing of the product and loading into the spray tank and from spray drift from the harvester. However, machine operators are protected from spray within an enclosed cab. On the basis of its biological properties, lack of toxicity and pathogenicity and its proposed use pattern, it is recommended that the product label include standard personal protective equipment.

4.0 Residues

4.1 Residue summary

Sylvanex will not be applied to food or feed crops; therefore, the establishment of a maximum residue limit (MRL) is not required for *Ophiostoma piliferum* strain D97 under Section 4(d) of the *Food and Drugs Act* (adulteration of food) as defined under Division 15, Section B.15.002 of the Food and Drugs Regulations. *Ophiostoma piliferum* is a naturally occurring microorganism that is widespread in the environment. It is not known as an aquatic fungus and therefore is not expected to proliferate in aquatic habitats. Moreover, the risk from non-occupational exposure is considered minimal as there is no evidence of adverse effects from oral, dermal or inhalation exposure. Drinking water is accordingly not being screened for *Ophiostoma piliferum* as a potential indicator of microbial contamination or as a direct pathogenic contaminant. Both percolation through soil and municipal treatment of drinking water reduce the possibility of exposure to *Ophiostoma piliferum* strain D97 through drinking water. Therefore, the potential of significant transfer to drinking water is minimal to non-existent, and the risk from consuming drinking water containing *Ophiostoma piliferum* strain D97 is minimal as there is no evidence of adverse effects from oral exposure to this agent.

5.0 Fate and behaviour in the environment

Environmental fate data (Tier II) were not triggered as adverse effects to non-target organisms are not expected from the proposed use of *Ophiostoma piliferum* strain D97.

6.0 Effects on non-target species

See Appendix II, tables 1 and 2, for summary tables.

6.1 Integrated environmental toxicology summary

Ophiostoma piliferum is one of the most commonly found sapstain fungi of coniferous lumber in the southern United States. This fungus is reported to be a widespread common sapstain fungus of coniferous wood in Europe. In Canada, *Ophiostoma piliferum* is found in logs and lumber of various pine and spruce species originating from numerous ecozones in Canada. The published literature concerning *Ophiostoma piliferum* indicates that this fungus is a saprophyte of dead wood or wood whose host-resistance mechanisms are severely impaired. It can colonize both hardwoods and softwoods, although the latter may be considered the preferred substrate. *Ophiostoma piliferum* and other sapstaining fungi are intimately linked with bark beetles that act as vectors. Spores of sapstain fungi are carried both externally on the body surface and internally within the intestinal tract. Some bark beetles have a specialized feature called a mycangium, which is used for transporting fungal spores.

Ophiostoma piliferum can metabolize the pitch components, i.e., triglycerides, fatty and diterpenoid resin acids, sterols and waxes. According to the literature, no cellulolytic or ligninolytic enzymes are produced. Usually, the growth of sapstain fungi causes a superficial discolouration of the wood. This discolouration is caused by the darkly pigmented hyphae of sapstain fungi. In *Ophiostoma piliferum* strain D97, no staining occurs as the pigments responsible for the stain are not produced, i.e., it is a pigmentless or albino strain. Pigment synthesis is blocked in the 1,8-dihydroxynaphthalene melanin synthetic pathway. *Ophiostoma piliferum* strain D97 does not destroy other sapstain fungi. It merely competes with the other sapstain fungi for the readily metabolizable sugars associated with fresh sapwood. Once the niche is occupied and the nutrients are captured, susbequent colonization by sapstain fungi does not occur. *Ophiostoma piliferum* is not considered to be a pathogen nor is it capable of parasitizing either plants or animals. No reports of adverse effects on birds, wild mammals, fish, arthropods, non-arthropod invertebrates, microorganisms or plants have been reported in the published literature. Furthermore, no overt signs of toxicity or pathogenicity were noted in any of the environmental toxicology studies submitted for review.

According to the proposed use pattern, Sylvanex is to be applied to lodgepole pine and red pine logs at forest-harvesting sites using a hydraulic spray system attached to various cutting and delimbing equipment. Consequently, the potential for exposure to terrestrial non-target species is high. However, the risk to non-target species is expected to be low based on the results of submitted studies and an absence of adverse effects reported in the published scientific literature. Consequently, *Ophiostoma piliferum* strain D97 is expected to pose little environmental risk when used in accordance with the proposed label directions. Furthermore, the formulants in the EP do not pose an environmental risk when used at the proposed application rates.

7.0 Efficacy

7.1 Effectiveness

7.1.1 Intended use

Sylvanex is a flaked end-use product containing the active ingredient *Ophiostoma piliferum* strain D97 proposed for use as a biological antisapstain product on freshly felled lodgepole pine and red pine logs at the felling site only. Sylvanex is to be diluted in water and applied during harvesting of the wood using a hydraulic spray system, attached to the harvesting equipment. There is no antisapstain product currently registered for this proposed use pattern.

7.1.2 Mode of action

Sylvanex contains blastospores of an albino (non-pigmented) strain of the sapstain fungus *Ophiostoma piliferum*. Colourless isolates occur naturally in forests and on wood products but are not commonly found because the lack of melanin makes them unfit for long-term survival in nature. Melanin would be essential for UV light protection, perithecial development and protection from mite and insect predation. The discolouration of wood typically associated with the growth of *Ophiostoma piliferum* does not occur with Sylvanex because the Sylvanex strain is blocked in the 1,8-dihydroxynaphthalene melanin synthetic pathway.

The principle behind the use of Sylvanex is a competition with the wild type pigmented sapstain fungi for the limited food source found in dead or dying wood. As Sylvanex is applied at a high concentration soon after felling, it is the first fungus to colonize the fresh sapwood. It can easily assimilate nutrients in sapwood before the blue-staining fungi present at natural background levels have a chance to establish themselves. Once nutrient resources are captured and the niche occupied, subsequent colonization by wild type pigmented fungi does not occur.

7.1.3 Nature of the pest problem

Sapstain is a grey, black or bluish discolouration of sapwood caused by the presence of black yeast, dark mould and blue-staining fungi. The discolouration greatly reduces the aesthetic quality and commercial value of timber but has little effect on wood strength. The superficial discolouration of wood by these fungi is caused by their dark pigmented hyphae. No actual staining of the wood cell walls occurs.

The blue-staining fungi commonly found in Canada are: *Aureobasidium pullulans*, *Ceratocystis adiposa*, *Ceratocystis coerulescens*, *Ophiostoma flexuosum*, *Ophiostoma floccosum*, *Ophiostoma ips*, *Ophiostoma minus*, *Ophiostoma piceae*, *Ophiostoma piceaperdum*, *Ophiostoma piliferum* and *Phacidium coniferarum*.

Spores of sapstain fungi are distributed mainly by insects, but distribution by wind and rain can also occur as well as during harvest and processing operations. Bark beetles may introduce blue stain through the bark of the logs. Dry air is ineffective in causing conidium dispersal, but both mist-laden air and splash droplets would dislodge and disseminate conidia relatively easily.

7.1.4 Effectiveness against pests

Efficacy trials were conducted in 2000 in Skookumchuck River Valley, British Columbia, and in 2000 and 2001 in the Elk River/Brazeau River Valley area of Alberta.

Lodgepole pine trees from these sites were felled and the stems delimbed using mechanical equipment. This process resulted in a moderate amount of bark damage. Test logs three to five metres long and free of bluestain and bark beetle attack were selected.

The entire surface of each log was sprayed to saturation (540 mL of Sylvanex suspension per square metre of log surface) with a Sylvanex suspension using a backpack sprayer fitted with a flat fan spray nozzle. The untreated controls were sprayed with water. After spraying, experimental logs were piled on bearers and covered with a layer of cover logs. These logs are used in order to compensate for the small size of the experimental piles. Temperatures inside piles of lumber are lower than outside air temperature during hot weather because of the cooling effect of evaporative moisture from the drying wood. Since this cooling effect is limited by the small size of the piles, the researcher added cover logs. In 2000, each treatment was applied to three piles of 10 logs and in 2001 each treatment was applied to two piles of 20 logs.

Six weeks after treatment, cover logs were removed and experimental logs from each pile were selected randomly. The remaining logs were covered again with the protective logs and sampled after an additional six weeks of storage. Fifty millimetre thick disks were taken along the length of each log. Additional discs were taken for moisture content determination. The extent of bluestain colonization was assessed by estimating the visible stain area on the disc surface using a transparent grid template with 2.5 × 2.5 mm units. The sapwood and heartwood diameter were measured and the amount of stain was expressed as a percentage of the sapwood area of each disc.

Staining results from the 2000 Alberta trials

Treatment	Mean sapwood surface area affected by sapstain (%)	
	1st sampling (10 Aug. 2000)	2nd sampling (19 Sept. 2000)
Control (water)	Negligible	11.41 ± 15.47
5×10^7 CFU/mL of Sylvanex	Negligible	1.54 ± 3.28*
1.5×10^7 CFU/mL of Sylvanex	Negligible	10.62 ± 12.18

* Statistically different from control ($p<0.05$)

Negligible stain was seen during the first sampling in Alberta and British Columbia (six weeks after treatment). The dry weather would have dried out logs quickly, thus preventing fungal growth. The report stated that the sapwood moisture content of logs was too low to support bluestain fungi growth. Statistical analysis (ANOVA) showed that there was no significant difference between untreated and treated logs.

Stain was found during the second Alberta sampling (13 weeks after treatment). The second British Columbia sampling was not carried on for unknown reasons. Statistical analysis (ANOVA) of the data showed that significantly less stain was found on logs treated with the highest concentration of Sylvanex than on the control logs ($p = 0.05$). The lowest Sylvanex treatment did not show a difference in stain from the untreated control.

The results from the above trials do not clearly demonstrate the efficacy of Sylvanex, possibly due to an absence of pest pressure. Since Sylvanex requires the same conditions as the wild type fungi to grow, it is not expected to perform as well under conditions that are not favourable to the pest.

Staining results from the 2001 Alberta trial

Treatment	Mean sapwood surface area affected by sapstain (%)	
	6 weeks	13 weeks
Control (water)	32.4 ± 17.7	64.4 ± 19.75
Sylvanex (5×10^7 CFU/mL)	0.9 ± 2.1	27.39 ± 23.8

Staining results from the 2000 Alberta trials

Treatment	Mean sapwood surface area affected by sapstain (%)	
	1st sampling (10 Aug. 2000)	2nd sampling (19 Sept. 2000)
Control (water)	Negligible	11.41 ± 15.47
5×10^7 CFU/mL of Sylvanex	Negligible	1.54 ± 3.28*
1.5×10^7 CFU/mL of Sylvanex	Negligible	10.62 ± 12.18

* Statistically different from control ($p<0.05$)

Negligible stain was seen during the first sampling in Alberta and British Columbia (six weeks after treatment). The dry weather would have dried out logs quickly, thus preventing fungal growth. The report stated that the sapwood moisture content of logs was too low to support bluestain fungi growth. Statistical analysis (ANOVA) showed that there was no significant difference between untreated and treated logs.

Stain was found during the second Alberta sampling (13 weeks after treatment). The second British Columbia sampling was not carried on for unknown reasons. Statistical analysis (ANOVA) of the data showed that significantly less stain was found on logs treated with the highest concentration of Sylvanex than on the control logs ($p < 0.05$). The lowest Sylvanex treatment did not show a difference in stain from the untreated control.

The results from the above trials do not clearly demonstrate the efficacy of Sylvanex, possibly due to an absence of pest pressure. Since Sylvanex requires the same conditions as the wild type fungi to grow, it is not expected to perform as well under conditions that are not favourable to the pest.

Staining results from the 2001 Alberta trial

Treatment	Mean sapwood surface area affected by sapstain (%)	
	6 weeks	13 weeks
Control (water)	32.4 ± 17.7	64.4 ± 19.75
Sylvanex (5×10^7 CFU/mL)	0.9 ± 2.1	27.39 ± 23.8

The 2001 trial used larger piles of logs than the first trials, which better represents normal harvesting operations where logs are less likely to dry out quickly. Only the high concentration suspension was tested (5×10^7 CFU/mL). The pest pressure seen in 2001 was greater than in 2000 as discs from untreated logs had a greater percentage of their surface stained. Statistical analysis of the 2001 data indicated that there was significantly less stain on the Sylvanex-treated logs than on the untreated logs. Treated logs were essentially stain free after the first 6 weeks and had less than half the stain coverage of control logs after 13 weeks.

It is not possible to compare the efficacy of Sylvanex against an established performance standard as these have not been developed for antisapstain products used on logs. Sylvanex is not expected to meet the stringent commercial standard for antisapstain products used on lumber (six month protection) as the data showed too much stain on treated logs. A comparison with a registered product is not possible as there is no currently available alternative for logs. Although the Sylvanex treatment did not provide the same level of efficacy in all submitted trials, the results did show an improvement over untreated logs. The efficacy of Sylvanex against sapstain is not expected to be constant as sapstain damage varies from year to year and fungal growth is dependent on environmental conditions. The results showed a statistically significant reduction of staining over a 13-week period. As logs are processed as soon as possible to avoid staining, the 13-week period of protection conferred by Sylvanex should be adequate in most cases. It should be noted that a retreatment after 13 weeks is not expected to make a difference as most of the nutrients will have been consumed by then.

The efficacy data only covered lodgepole pine. The applicant did provide some published articles indicating that Sylvanex reduces colonization of sapstain fungi on aspen (*Populus tremuloides*) and red pine (*Pinus resinosa*) but the reduction in percentages of surface stained were not reported. Although the paper by Uzunovic et al. (1999) indicates that *Ophiostoma piliferum* was isolated on four of the five wood species sampled, it was found on only 50 logs of a total of 878 sampled logs (6%). As it is not encountered at a high frequency, it may not be the most competitive sapstain fungi and it is not possible to predict if it would grow well enough on other wood species to confer protection against sapstain. Consequently, the efficacy data submitted support application of Sylvanex to lodgepole pine only. Sylvanex may also be used on red pine as a published paper showed its potential to grow on red pine but confirmatory data will be required. The report from the study conducted in 2002 on red pine under a research permit needs to be submitted to support full registration of the use of Sylvanex on red pine. The following will have to be added to the label: *"Sylvanex is to be used on freshly-felled lodgepole pine and red pine logs as a preventative treatment against sapstain."*

In order to be efficacious, Sylvanex needs to establish itself on logs as soon as possible to avoid colonization by wild type sapstain fungi and this requires the application of a large number of spores per square metre. The trial rates do not appear to be excessive since the low application rate used in the first trial did not show a statistically significant difference from the untreated control. Therefore, the trial application rate of 540 mL of

a 5×10^7 CFU/mL (0.05 AU/L) suspension per square metre of wood surface tested is acceptable. However, the label proposed rate is expressed in activity units per ton of wood rather than in volume of suspension per square metre of surface. As the amount of Sylvanex used will depend on the surface area to be treated and not the weight of the wood, the label rate will have to be expressed as in the trials. A specific guarantee reflecting the actual number of AU of each batch will be given on the label in order to calculate the dilution required to obtain the 0.05 AU/L concentration of the Sylvanex suspension. Sylvanex is not expected to prevent the growth of sapstain fungi once they have been established.

The submitted documents indicate that a hydraulic spray system, attached to various cutting and delimbing equipment, must be used for application at the logging site. This application method should ensure full coverage of the logs and is acceptable from an efficacy point of view.

It should be noted that there is no reason to believe that Sylvanex could revert to a coloured phenotype as it has been studied and used as a wood pitch control agent for many years. Any instability in the phenotype would have been identified.

7.2 Phytotoxicity to target plants (including different cultivars), or to target plant products (OECD 7.4)

Not applicable as Sylvanex is only applied once the tree has been cut.

7.3 Observations on undesirable or unintended side effects

Sapstain is caused by pigmented fungi that invade wood cells and consume some of the tree components to support their growth. Although it is generally accepted that sapstain fungi do not affect the functional properties of the wood, some species can produce enzymes that can damage wood. A report on the effects of Sylvanex and other blue-staining fungi on the toughness and bending strength of lodgepole pine was submitted. A published study on the effects of bluestain on wood toughness and weight was also submitted. These studies did not find any significant impact of staining fungi on toughness, weight and bending strength of stained/treated wood. Therefore, the use of Sylvanex on freshly felled logs is not expected to result in adverse effects to the wood being treated.

7.4 Economics

This has not been assessed. However, it is generally recognized that a significant percentage of wood can be stained by sapstaining fungi and that stained wood has significantly less market value.

7.5 Sustainability

7.5.1 Survey of alternatives

7.5.1.1 Non-chemical control practices

The applicant indicated that control of bluestain fungi has previously been accomplished by sprinkling logs with water, which lowered oxygen content resulting in some inhibition of fungal colonization. However, this required the use of large volume of water, which raised environmental concerns. Harvested trees can be sometimes floated down river to lumber mills or stored in ponds, which also result in some inhibition of fungal colonization. Trees may also be harvested in winter, where possible, when fungal inoculum and insect activity are lowest.

7.5.1.2 Chemical control practices

There are no currently registered control products for the control of sapstain on freshly felled logs. Currently registered antisapstain control products can only be applied on freshly sawn lumber.

7.5.2 Compatibility with current management practices including integrated pest management

There are no current pest management practices used for the control of sapstain on freshly felled logs other than those identified in Section 7.5.1.1.

7.5.3 Contribution to risk reduction

There are no currently registered control products for the control of sapstain on freshly felled logs.

7.5.4 Information on the occurrence or possible occurrence of the development of resistance

Sylvanex contains living fungi that are applied at a high concentration to limit the development of sapstain on freshly felled logs. The mode of action consists of consuming the available nutrient from the logs preventing the establishment of wild type sapstain fungi. As Sylvanex is competitive rather than toxic to wild type fungi, resistance is not expected to develop.

7.6 Conclusions

The efficacy data support the claim that Sylvanex will control blue-staining/sapstain fungi on freshly felled lodgepole pine logs. Confirmatory data described in Section 9.0 is required to support full registration.

Value summary

Proposed		Recommendation (based on value assessment)	Comments
Site/pest	Details		
Sapstain on freshly felled logs	Typically used at a rate of 0.05–0.1 AU/ton of wood, or approximately 1×10^{13} CFU per cubic metre of wood. Apply to freshly cut wood at the felling site or soon thereafter at a log storage yard.	First determine the volume in litres of Sylvanex suspension required for daily operation by multiplying the total surface area in square metres of logs to be treated by 0.54 L. Then, determine the quantity of Sylvanex powder to be added to the water by using the following formula: Number of grams of Sylvanex required = [Volume, in litres, of Sylvanex suspension required for daily operation] × 50 ÷ [label guarantee (in AU/kg)]. Weigh the required quantity of dried powder and rehydrate it by mixing it with water that is 4–30 °C and pH 5–8.4. Use a stirrer to get a vortex. Allow sufficient time for the mixture to become homogeneous before using it. The final Sylvanex suspension will have a concentration of 0.05 AU/L (5.8×10^{11} CFU per litre). This suspension must be used within 24 hours of mixing. The 0.05 AU/L suspension of Sylvanex is to be applied to logs immediately after the harvesting of the wood and cutting/delimbing of branches. The entire surface of each log must be sprayed at a rate of 540 mL per square metre of log surface. A hydraulic spray system, attached to the various cutting and delimbing equipment, must be used for application at the logging site.	a) To be used in the control of blue-staining sapstain fungi on freshly felled lodgepole pine and red pine logs at the felling site only. NOT for use on lumber or debarked logs. b) Sylvanex is to be used on freshly felled lodgepole pine and red pine logs as a preventative treatment against sapstain. c) A hydraulic spray system, attached to the various cutting and delimbing equipment, must be used for application at the logging site.

Value summary

Proposed		Recommendation (based on value assessment)	Comments
Site/pest	Details		
Sapstain on freshly felled logs.	Typically used at a rate of 0.05–0.1 AU/ton of wood, or approximately 1×10^{11} CFU per cubic metre of wood. Apply to freshly cut wood at the felling site or soon thereafter at a log storage yard.	First determine the volume in litres of Sylvanex suspension required for daily operation by multiplying the total surface area in square metres of logs to be treated by 0.54 L. Then, determine the quantity of Sylvanex powder to be added to the water by using the following formula: Number of grams of Sylvanex required = [Volume, in litres, of Sylvanex suspension required for daily operation] × 50 ÷ [label guarantee (in AU/kg)]. Weigh the required quantity of dried powder and rehydrate it by mixing it with water that is 4–30°C and pH 5–8. Use a stirrer to get a vortex. Allow sufficient time for the mixture to become homogeneous before using it. The final Sylvanex suspension will have a concentration of 0.05 AU/L (5.0×10^{10} CFU per litre). This suspension must be used within 24 hours of mixing. The 0.05 AU/L suspension of Sylvanex is to be applied to logs immediately after the harvesting of the wood and cutting/delimbing of branches. The entire surface of each log must be sprayed at a rate of 540 mL per square metre of log surface. A hydraulic spray system, attached to the various cutting and delimbing equipment, must be used for application at the logging site.	a) To be used in the control of blue-staining sapstain fungi on freshly felled lodgepole pine and red pine logs at the felling site only. NOT for use on lumber or debarked logs. b) Sylvanex is to be used on freshly felled lodgepole pine and red pine logs as a preventative treatment against sapstain. c) A hydraulic spray system, attached to the various cutting and delimbing equipment, must be used for application at the logging site.

8.0 Toxic Substances Management Policy considerations

During the review of Sylvanex, the PMRA has taken into account the federal Toxic Substances Management Policy[1] and has followed Regulatory Directive DIR99-03[2]. It has been determined that this product does not meet TSMP Track 1 criteria because the active ingredient is a biological organism and hence is not subject to the criteria used to define persistence, bioaccumulation and toxicity properties of chemical control products. Furthermore, the active ingredient (technical grade) does not contain any by-products or microcontaminants that meet the TSMP Track 1 criteria. Impurities of toxicological concern are not expected to be present in the raw materials nor are they expected to be generated in sufficient quantities during the manufacturing process to present a risk to human health and safety. Also, there are no formulants of toxicological concern present in the Sylvanex end-use formulation.

9.0 Regulatory decision

The active ingredient *Ophiostoma piliferum* strain D97 (Sylvanex Technical) and the associated end-use product Sylvanex have been granted temporary registration pursuant to Section 17 of the Pest Control Products Regulations for use as a biological antisapstain product to control blue-staining fungi on freshly felled logs at the felling site, subject to the following conditions:

- A new product specification form
- Annual Certificates of analysis
- Hypersensitivity incident reporting
- Additional storage stability
- A dermal toxicity study
- Efficacy data.

---

1 The federal Toxic Substances Management Policy is available through Environment Canada's Web site at: www.ec.gc.ca/toxics

2 The Pest Management Regulatory Agency's Strategy for Implementing the Toxic Substances Management Policy, DIR99-03, is available through the Pest Management Information Service. Phone: 1 800 267-6315 within Canada or (613) 736-3799 outside Canada (long distance charges apply); Fax: (613) 736-3798; E-mail: pmra_infoserv@hc-sc.gc.ca or through our website at www.hc-sc.gc.ca/pmra-arla.

List of abbreviations

ANOVA	analysis of variance
AU	activity unit
CFU	colony forming unit
cps	centipoise
EP	end-use product
LOAEL	lowest observed adverse effect level
MAS	maximum average score
MIS	maximum irritation score
MPCA	microbial pest control agent
MRL	maximum residue limit
NOAEL	no observed adverse effect level
NOEL	no observed effect level
NRRL	Northern Regional Research Laboratory
NZW	New Zealand white
PCP	pest control product
PDA	potato dextrose agar
PMRA	Pest Management Regulatory Agency
PPE	personal protective equipment
QA	quality assurance
RFLP	restriction fragment length polymorphism
TGAI	technical grade active ingredient
TSMP	Toxic Substances Management Policy
USDA	United States Department of Agriculture
USEPA	United States Environmental Protection Agency
USFDA	United States Food and Drugs Administration
UV	ultraviolet

Appendix I Toxicology

Table 1 Summary of toxicity and infectivity studies with *Ophiostoma piliferum* Strain C-1 det 5

STUDY	SPECIES/STRAIN AND DOSES	LD_{50}, NOEL/NOAEL AND LOAEL	TARGET ORGAN/SIGNIFICANT EFFECTS/COMMENTS
ACUTE STUDIES			
Oral toxicity/ pathogenicity	Rat—Crl: CD® (SD) BR VAF PLUS 15/sex treated with live C-1 det 5, 2 mL/kg bw, or ~ 10^9 CFU/kg bw 5/sex treated with heat-killed C-1 det 5, 2 mL/kg bw	LD_{50} greater than 10^9 CFU/kg bw	No clinical signs indicative of toxicity or pathogenicity, no mortalities, no abnormalities on necropsy, no recovery of *Ophiostoma piliferum* from tissues (brain, heart, liver, lungs, spleen, kidneys, mesenteric lymph nodes), from gastrointestinal tract contents (stomach, small intestine or cecum), urine or feces on Sabouraud-Dextrose agar[1]. LOW TOXICITY, NOT PATHOGENIC
Pulmonary toxicity/ pathogenicity	Rat—Crl: CD® (SD) BR VAF PLUS 18/sex treated with live C-1 det 5, 1.2 mL/kg bw, or ~ 10^9 CFU/kg bw 5/sex treated with heat-killed C-1 det 5 1.2 mL/kg bw	LD_{50} greater than 10^9 CFU/kg bw	No clinical signs indicative of toxicity or pathogenicity, no mortalities, no abnormalities on necropsy. Transient recovery of *Ophiostoma piliferum* from lungs (cleared by day 4). No recovery of *Ophiostoma piliferum* from other tissues (brain, heart, liver, spleen, kidneys, mesenteric lymph nodes), from gastrointestinal tract contents (stomach, small intestine or cecum), urine or feces on Sabouraud-Dextrose agar[1]. LOW TOXICITY, NOT PATHOGENIC
Dermal toxicity	Rabbit—NZW 5/sex treated with 2 mL live C-1 det 5 (2.3×10^9 CFU) on a 10 cm^2 area of the back, occluded for 24 hours, then washed off.	LD_{50} greater than 8×10^8 CFU/kg bw	No mortalities. No signs of skin irritation (see below). Definitive conclusions could not be drawn because too low a dose was administered. Note that a suspension of *Ophiostoma piliferum* strain C-1 det 5 was used in testing, not the EP. This is acceptable because no additional ingredients are incorporated in formulation of the EP and both strains are biologically equivalent. SUPPLEMENTAL
Dermal irritation	Rabbit—NZW See dermal toxicity study, above.	MIS[2] 0/8 (all timepoints) MAS[3] 0/8 (24, 48, 72 h)	No signs of dermal irritation. NON-IRRITATING

Appendix I Toxicology

Table 1 Summary of toxicity and infectivity studies with *Ophiostoma piliferum* Strain C-1 det 5

STUDY	SPECIES/STRAIN AND DOSES	LD_{50} NOEL/NOAEL AND LOAEL	TARGET ORGAN/SIGNIFICANT EFFECTS/COMMENTS
ACUTE STUDIES			
Oral toxicity/ pathogenicity	Rat – Crl: $CD^{®}$ (SD) BR VAF PLUS 15/sex treated with live C-1 det 5, 2 ml/kg bw, or $\geq 10^{9}$ CFU/kg bw 5/sex treated with heat-killed C-1 det 5, 2 ml/kg bw	LD_{50} greater than 10^{9} CFU/kg bw	No clinical signs indicative of toxicity or pathogenicity, no mortalities, no abnormalities on necropsy, no recovery of *Ophiostoma piliferum* from tissues (brain, heart, liver, lungs, spleen, kidneys, mesenteric lymph nodes), from gastrointestinal tract contents (stomach, small intestine or cecum), urine or feces on Sabouraud-Dextrose agar[1] LOW TOXICITY, NOT PATHOGENIC
Pulmonary toxicity/ pathogenicity	Rat – Crl: $CD^{®}$ (SD) BR VAF PLUS 18/sex treated with live C-1 det 5, 1.2 ml/kg bw, or 10^{9} CFU/kg bw 5/sex treated with heat-killed C-1 det 5 1.2 ml/kg bw	LD_{50} greater than 10^{9} CFU/kg bw	No clinical signs indicative of toxicity or pathogenicity, no mortalities, no abnormalities on necropsy. Transient recovery of *Ophiostoma piliferum* from lungs (cleared by day 4). No recovery of *Ophiostoma piliferum* from other tissues (brain, heart, liver, spleen, kidneys, mesenteric lymph nodes), from gastrointestinal tract contents (stomach, small intestine or cecum), urine or feces on Sabouraud-Dextrose agar[1] LOW TOXICITY, NOT PATHOGENIC
Dermal toxicity	Rabbit – NZW 5/sex treated with 2 ml, live C-1 det 5 (2.3×10^{9} CFU) on a 10 cm^{2} area of the back, occluded for 24 hours, then washed off.	LD_{50} greater than 8×10^{9} CFU/kg bw	No mortalities. No signs of skin irritation (see below). Definitive conclusions could not be drawn because too low a dose was administered. Note that a suspension of *Ophiostoma piliferum* strain C-1 det 5 was used in testing, not the EP. This is acceptable because no additional ingredients are incorporated in formulation of the EP and both strains are biologically equivalent. SUPPLEMENTAL
Dermal irritation	Rabbit – NZW See dermal toxicity study, above	MIS[2] 0.8 (all timepoints) MAS[3] 0.8 (24, 48, 72 h)	No signs of dermal irritation NON-IRRITATING

STUDY	SPECIES/STRAIN AND DOSES	LD, NOEL/NOAEL AND LOAEL	TARGET ORGAN/SIGNIFICANT EFFECTS/COMMENTS
Eye irritation	Rabbit—NZW 3/sex treated with 0.1 mL live C-1 det 5 (1.15×10^8 CFU)	MIS[2] 4.67/110 (1 h) MAS[3] 1.11/110 (24, 48, 72 h)	No corneal or iridial damage was observed. Conjunctival redness resolved by day 4. Note that the TGAI was used in testing, not the EP. Although no additional ingredients are incorporated during formulation of the EP, as a powder, the EP is potentially abrasive and therefore irritating to the eyes. SUPPLEMENTAL

1 Although the sensitivity of detection of *Ophiostoma piliferum* on Sabouraud-Dextrose agar was not independently evaluated, the same medium was used effectively for titration of the inoculum, and recovery of *Ophiostoma piliferum* was reported from the lungs in the acute pulmonary study.

2 MIS = maximum irritation score

3 MAS = maximum average score

Appendix II Environmental assessment

Table 1 Risks of *Ophiostoma piliferum* strain D97 to non-target terrestrial organisms

Organism	Exposure	Test substance	Conclusions
Arthopods	Acute	Waiver rationale submitted in lieu of data	The waiver rationale submitted by the applicant was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.
Birds	Oral/ Pulmonary/ Inhalation/ Injection	Waiver rationale submitted in lieu of data	The waiver rationale submitted by the applicant was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.
Wild mammals	Acute	Not required	This guideline requirement was not triggered based on the lack of significant adverse effects in the published literature and in the toxicological studies described in Section 3.
Plants	Acute— *Pinus resinosa* *Pinus banksiana* *Pinus sylvestris* *Pinus taeda* *Pinus elliottii* *Pinus palustris*	*Ophiostoma piliferum* strain D97	Study: None of the wounded trees died during the study period and all the wounds were closed with the exception of two trees. In *P. taeda*, 1/10 wounds treated with *Ophiostoma piliferum* strain D97 and 1/10 wounds treated with the wild strain of *Ophiostoma piliferum* had callus tissue but pitch exudate prevented complete closure. Based on these results, *Ophiostoma piliferum* strain D97 is not pathogenic to six species of pine. This pathogenicity study is classified as acceptable but does not completely satisfy the PMRA's requirement for terrestrial toxicity/pathogenicity study, as no adequate observations were made to assess sublethal toxicity (e.g., growth vigour). Waiver rationale: The waiver rationale submitted by the applicant was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.
	Acute	Waiver rationale submitted in lieu of data	
Soil microorganisms	Acute	Not required	This data requirement was not triggered.
Non-arthropod invertebrates	Acute	Not required	This data requirement was not triggered.

STUDY	SPECIES/STRAIN AND DOSES	LD_{50} NOEL/NOAEL AND LOAEL	TARGET ORGAN/SIGNIFICANT EFFECTS/COMMENTS
Eye irritation	Rabbit – NZW 3/sex treated with 0.1 mL five C+I det 5 (1.15×10^8 CFU)	MIS[1] 4.67/110 (1 h) MAS[2] 1.11/110 (24, 48, 72 h)	*No corneal or iridial damage was observed.* Conjunctival redness resolved by day 4. Note that the TGAI was used in testing, not the EP. Although no additional ingredients are incorporated during formulation of the EP, as a powder, the EP is potentially abrasive and therefore irritating to the eyes. SUPPLEMENTAL

[1] Although the sensitivity of detection of *Ophiostoma piliferum* on Sabouraud-Dextrose agar was not independently evaluated, the same medium was used effectively for titration of the inoculum, and recovery of *Ophiostoma piliferum* was reported from the lungs in the acute pulmonary study.

MIS – maximum irritation score

MAS – maximum average score

Appendix II Environmental assessment

Table 1 Risks of *Ophiostoma piliferum* strain D97 to non-target terrestrial organisms

Organism	Exposure	Test substance	Conclusions
Arthropods	Acute	Waiver rationale submitted in lieu of data	The waiver rationale submitted by the applicant was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.
Birds	Oral/ Pulmonary Inhalation/ Injection	Waiver rationale submitted in lieu of data	The waiver rationale submitted by the applicant was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.
Wild mammals	Acute	Not required	This guideline requirement was not triggered based on the lack of significant adverse effects in the published literature and in the toxicological studies described in Section 4.
Plants	Acute *Pinus resinosa* *Pinus banksiana* *Pinus sylvestris* *Pinus taeda* *Pinus elliottii* *Pinus palustris*	*Ophiostoma piliferum* strain D97	Study None of the wounded trees died during the study period and all the wounds were closed with the exception of two trees. In *P. taeda*, 1/10 wounds treated with *Ophiostoma piliferum* strain D97 and 1/10 wounds treated with the wild strain of *Ophiostoma piliferum* had callus tissue but patch exudate prevented complete closure. Based on these results, *Ophiostoma piliferum* strain D97 is not pathogenic to six species of pine. This pathogenicity study is classified as acceptable but does not completely satisfy the PMRA's requirement for terrestrial toxicity/pathogenicity study, as no adequate observations were made to assess sublethal toxicity (e.g., growth vigour). Waiver rationale The waiver rationale submitted by the applicant was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.
	Acute	Waiver rationale submitted in lieu of data	
Soil microorganisms	Acute	Not required	This data requirement was not triggered.
Non-arthropod invertebrates	Acute	Not required	This data requirement was not triggered.

Table 2 Risks of *Ophiostoma piliferum* strain D97 to non-target aquatic organisms

Organism	Exposure	Test substance	Conclusions
Freshwater arthropods	Acute—*Daphnia magna*	Cartapip 58 1000 mg/L (Nominal)	*Daphnia magna* study: No adverse effects were noted for any of the daphnids throughout the study. The LC_{50} was greater than 1000 mg/L. This study is classified as acceptable but does not fully satisfy the PMRA's requirement for an aquatic arthropod toxicity/pathogenicity study, no definitive conclusions could be made regarding the MPCA's potential for infectivity and pathogenicity.
	Acute—*Ceriodaphnia dubia*	Effluent from Cartapip-treated wood chips 100, 50, 25, 12.5, 6.2 and 0%	*Ceriodaphnia dubia* study: After 24 hours, 5/20 daphnids died in the group exposed to 100% effluent from treated wood chips. After 48 hours, a daphnid (1/20) died in each of the groups exposed to 50% and 100% effluent from untreated wood chips and 6/20 daphnids died in the group exposed to 100% effluent from wood chips treated with Cartapip 58. This study is classified as acceptable but does not fully satisfy the PMRA's requirement for an aquatic arthropod toxicity/pathogenicity study, as the test substance was neither the TGAI nor the EP and no definitive conclusions could be made regarding the MPCA's potential for infectivity and pathogenicity. No replacement study is required based on *Ophiostoma piliferum*'s biological properties and the absence of adverse effects in the published literature.

Organism	Exposure	Test substance	Conclusions
Freshwater fish	Acute	Cartapip 58 1000 mg/L (nominal)	No adverse effects were noted in any of the fish throughout the duration of the study. The LC_{50} was greater than 1000 mg/L. The rainbow trout toxicity study is classified as acceptable, but it does not completely satisfy the PMRA's requirement for a freshwater fish toxicity/pathogenicity study, as no definitive conclusions could be made regarding the MPCA's potential for infectivity and pathogenicity. No replacement study is required based on *Ophiostoma piliferum*'s biological properties and the absence of adverse effects in the published literature.
Freshwater plants	Acute	Waiver rationale submitted in lieu of data	The waiver rationale submitted by the applicant was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.
Estuarine and marine arthropods	Acute	Waiver rationale submitted in lieu of data	The waiver rationale submitted by the applicant was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.
Estuarine and marine fish	Acute	Waiver rationale submitted in lieu of data	The waiver rationale submitted by the applicant was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.

Table 2 **Risks of *Ophiostoma piliferum* strain D97 to non-target aquatic organisms**

Organism	Exposure	Test substance	Conclusions
Freshwater arthropods	Acute *Daphnia magna*	Cartapip 58 1000 mg/L (Nominal)	*Daphnia magna* study: No adverse effects were noted for any of the daphnids throughout the study. The LC_{50} was greater than 1000 mg/L. This study is classified as acceptable but does not fully satisfy the PMRA's requirement for an aquatic arthropod toxicity/pathogenicity study, no definitive conclusions could be made regarding the MPCA's potential for infectivity and pathogenicity.
	Acute *Ceriodaphnia dubia*	Effluent from Cartapip-treated wood chips 100, 50, 25, 12.5, 6.2 and 0%	*Ceriodaphnia dubia* study: After 24 hours, 5/20 daphnids died in the group exposed to 100% effluent from treated wood chips. After 48 hours, a daphnid (1/20) died in each of the groups exposed to 50% and 100% effluent from untreated wood chips and 6/20 daphnids died in the group exposed to 100% effluent from wood chips treated with Cartapip 58. This study is classified as acceptable but does not fully satisfy the PMRA's requirement for an aquatic arthropod toxicity/pathogenicity study, as the test substance was neither the TGAI nor the EP and no definitive conclusions could be made regarding the MPCA's potential for infectivity and pathogenicity. No replacement study is required based on *Ophiostoma piliferum*'s biological properties and the absence of adverse effects in the published literature.

Organism	Exposure	Test substance	Conclusions
Freshwater fish	Acute	Cartapip 58 1000 mg/L (nominal)	No adverse effects were noted in any of the fish throughout the duration of the study. The LC_{50} was greater than 1000 mg/L. The rainbow trout toxicity study is classified as acceptable, but it does not completely satisfy the PMRA's requirement for a freshwater fish toxicity/pathogenicity study, as no definitive conclusions could be made regarding the MPCA's potential for infectivity and pathogenicity. No replacement study is required based on *Ophiostoma piliferum*'s biological properties and the absence of adverse effects in the published literature.
Freshwater plants	Acute	Waiver rationale submitted in lieu of data	The waiver rationale submitted by the applicant was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.
Estuarine and marine arthropods	Acute	Waiver rationale submitted in lieu of data	The waiver rationale submitted by the applicant was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.
Estuarine and marine fish	Acute	Waiver rationale submitted in lieu of data	The waiver rationale submitted by the applicant was **ACCEPTED** based on a limited potential for risk.

References

Harrington, T. C. 1981. Cycloheximide sensitivity as a taxonomic character in *Ceratocystis*. *Mycologia*. 73:1123–1129.

Hunt, J. 1956. Taxonomy of the genus *Ceratocystis*. *Lloydia*. 19(1):1–30.

Uzunovic, A., D.-Q. Yang, P. Gagné, C. Breuil, L. Bernier, A. Byrne, M. Gignac, and S. H. Kim. 1999. Fungi that cause sapstain in Canadian softwoods. *Canadian Journal of Microbiology*. 45:914–922.

Verrall, A. F. 1939. Relative importance and seasonal prevalence of wood-staining fungi in the southern states. *Phytopathology*. 29:1031–1051.

Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire
Pest Management Regulatory Agency

Note réglementaire

REG2004-05

Ophiostoma piliferum souche D97

Sylvanex technique (MAQT)
Sylvanex (PC)

L'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA), en vertu de l'article 17 du *Règlement sur les produits antiparasitaires* (RPA), a accordé des homologations temporaires à la matière active microbienne *Ophiostoma piliferum* (souche D97) (Sylvanex technique) et à sa préparation commerciale connexe, le Sylvanex, pour usage au point de chute sur le bois fraîchement abattu (le pin tordu et le pin rouge) comme produit biologique antitache colorée de l'aubier afin de supprimer les champignons causant le bleuissement.

Cette note réglementaire présente un sommaire des données examinées et expose les raisons qui justifient la décision réglementaire touchant ces produits.

(also available in English)

Le 30 mars 2004

Ce document est publié par la Division des nouvelles stratégies et des affaires réglementaires, Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire. Pour de plus amples renseignements, veuillez communiquer avec la :

Coordonnatrice des publications
Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire
Santé Canada
I.A. 6605C
2720, promenade Riverside
Ottawa (Ontario)
K1A 0K9

Internet : pmra_publications@hc-sc.gc.ca
www.hc-sc.gc.ca/pmra-arla/
Service de renseignements :
1-800-267-6315 ou (613) 736-3799
Télécopieur : (613) 736-3798

ISBN : 0-662-76503-6 (0-662-76504-4)
Numéro de catalogue : H113-7/2004-5F (H113-7/2004-5F-PDF)

© Sa Majesté la Reine du chef du Canada, représentée par le Ministre des Travaux publics et Services gouvernementaux Canada 2004

Tous droits réservés. Il est interdit de reproduire ou de transmettre l'information (ou le contenu de la publication ou produit), sous quelque forme ou par quelque moyen que ce soit, enregistrement sur support magnétique, reproduction électronique, mécanique, ou par photocopie, ou autre, ou de l'emmagasiner dans un système de recouvrement, sans l'autorisation écrite préalable du Ministre des Travaux publics et Services gouvernementaux Canada, Ottawa, Ontario K1A 0S5.

Avant-propos

L'ARLA de Santé Canada a examiné les demandes d'homologation de la matière active de qualité technique (MAQT) *Ophiostoma piliferum* souche D97, SYLVANEX TECHNIQUE, et de sa préparation commerciale (PC) connexe, SYLVANEX, fabriquées par la société AgraSol Inc. pour la suppression des champignons causant le bleuissement sur le pin tordu et le pin rouge fraîchement abattus, au point de chute.

Le SYLVANEX est un produit microbien antitache colorée de l'aubier qui contient 76 % (p/p) de la souche D97 du champignon *Ophiostoma piliferum* pour lutter contre les champignons causant le bleuissement sur le pin tordu et le pin rouge fraîchement abattus, au point de chute. Le microorganisme actif, la souche D97 du champignon *Ophiostoma piliferum*, est un champignon d'origine naturelle; il n'est présentement pas homologué aux États-Unis en tant que produit antitache colorée de l'aubier. À l'heure actuelle, il n'y a pas de produit antitache colorée de l'aubier qui possède une homologation pour le profil d'emploi proposé pour Sylvanex.

À titre de condition à cette homologation temporaire, la société AgraSol Inc. devra effectuer des études supplémentaires. Après l'examen de ces nouveaux renseignements, l'ARLA publiera un projet de décision d'homologation (PRDD) et sollicitera les commentaires des parties intéressées avant de rendre une décision d'homologation finale.

Table des matières

1.0 La matière active, ses propriétés et ses utilisations 1
1.1 Description de la matière active et de ses impuretés 1
1.2 Propriétés physiques et chimiques de la matière active et de sa préparation commerciale 2
1.3 Détails relatifs aux utilisations et renseignements supplémentaires 3

2.0 Méthodes d'analyse 5
2.1 Méthode d'analyse de la matière active telle que fabriquée 5
2.1.1 Méthodes d'identification des microorganismes 5
2.1.2 Méthodes de détermination de la pureté des cultures d'ensemencement 6
2.1.3 Méthodes de détermination du contenu en microorganismes dans le produit obtenu en vue de la fabrication de la formulation 7
2.1.4 Méthodes de détermination des impuretés pertinentes dans le produit fabriqué 7
2.1.5 Méthodes utilisées pour montrer l'absence de pathogènes humains ou mammifères 8
2.1.6 Méthodes utilisées pour déterminer la stabilité à l'entreposage et la durée de vie du microorganisme 8
2.2 Méthode d'analyse de la formulation 9

3.0 Effets sur la santé humaine ou animale 9
3.1 Sommaire intégré de la toxicité et de l'infectiosité 9
3.2 Incidence d'hypersensibilité 10
3.3 Effets sur la santé humaine ou animale découlant de l'exposition à la matière active ou aux impuretés qu'elle contient 10
3.3.1 Évaluation de l'exposition professionnelle et occasionnelle 10

4.0 Résidus 11
4.1 Sommaire des résidus 11

5.0 Comportement et devenir dans l'environnement 11

6.0 Effets sur les organismes non visés 12
6.1 Sommaire intégré de la toxicologie environnementale 12

7.0 Efficacité 13
7.1 Efficacité 13
7.1.1 Utilisation proposée 13
7.1.2 Mode d'action 13
7.1.3 Nature du problème parasitaire 14
7.1.4 Efficacité contre les organismes nuisibles 14
7.2 Phytotoxicité pour les plantes cibles (y compris divers cultivars) ou les produits végétaux cibles (OCDE 7.4) 18
7.3 Observations d'effets secondaires indésirables ou non voulus 18
7.4 Aspects économiques 18
7.5 Pérennité 18
7.5.1 Recensement des solutions de rechange 18
7.5.2 Compatibilité avec les pratiques actuelles de gestion, y compris la lutte intégrée 19
7.5.3 Contribution à la réduction des risques 19
7.5.4 Renseignements sur l'acquisition réelle ou potentielle d'une résistance 19
7.6 Conclusions 19

8.0 Considérations relatives à la Politique de gestion des substances toxiques 21

9.0 Décision réglementaire 21

Liste des abréviations 23

Annexe I Toxicologie 25
Tableau 1 Sommaire des études de toxicité et d'infectiosité avec la souche C-1 det 5 d'*Ophiostoma piliferum* 25

Annexe II Évaluation environnementale 27
Tableau 1 Risques de la souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* pour les organismes terrestres non visés 27
Tableau 2 Risques de la souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* pour les organismes aquatiques non visés 29

Références 31

1.0 La matière active, ses propriétés et ses utilisations

1.1 Description de la matière active et de ses impuretés

Description de la MAQT

Microorganisme actif	*Ophiostoma piliferum* souche D97
Utilité	Produit biologique antitache colorée de l'aubier
Nom scientifique	*Ophiostoma piliferum*
Ordre taxonomique	
Règne :	Eumycètes
Phylum :	Dikaryomycota
Subphylum :	Ascomycotina
Classe :	Ascomycètes
Ordre :	Ophiostomatales
Famille :	Ophiostomataceae
Genre :	*Ophiostoma*
Espèce :	*piliferum*
Souche:	WZ5803D97 (abréviation – D97)
Renseignements relatifs à des brevets canadiens	Le fabricant a obtenu un brevet (Demande de brevet canadien n° 2009622), émis le 30 novembre 1999 sous l'ancien nom commercial Cartapip 97, pour réduire la teneur en poix dans la pâte de bois. Le fabricant a aussi fait une demande de brevet (Demande de brevet canadien n° 2149808) pour le Cartapip 97 en tant qu'agent de lutte biologique destiné aux produits forestiers et à l'écorçage et en tant que champignon pour réduire la teneur en poix (Demande de brevet canadien n° 2047900).
Pureté nominale de la matière active	Le Sylvanex technique (MAQT) se compose de 57 % de matière active dans un milieu de fermentation épuisé de 1,5 % correspondant à 20 – 50 unité actives (UA)/kg [où 1 UA équivaut à 1×10^{12} cellules souches unipotentes (CFU) de la souche D97 du champignon *Ophiostoma piliferum*]. La PC Sylvanex contient 76 % de m.a. p/p (équivalent à 30 – 50 UA/kg).

Nature des impuretés d'importance toxicologique, environnementale ou autre	La substance de qualité technique ne contient aucune impureté ou microcontaminant figurant sur la liste des substances de la voie 1 de la Politique de gestion des substances toxiques (PGST). Lors de la production des cultures, on vérifie le taux de croissance microbienne et l'albinisme avant de les utiliser comme inoculum. Le produit final est aussi soumis à des analyses de contamination microbienne (*Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, coliformes totaux, coliformes fécaux, nombre de levure et de moisissures, streptocoques fécaux). Les lots qui dépassent les limites établies en ce qui concerne les contaminants microbiens doivent être détruits. La souche D97 ne produit pas de substance toxique connue pour les mammifères.

1.2 Propriétés physiques et chimiques de la matière active et de sa préparation commerciale

Produit de qualité technique : Sylvanex technique

Propriété	**Résultat**
État physique	Suspension
pH dans l'eau distillée	6 – 7
Densité	1000 kg/m^3
Viscosité	400 centipoises

Préparation commerciale : Sylvanex

Propriété	**Résultat**
Couleur	Brun tan
État physique	Flocon
Garantie	76 % p/p (équivalent à 30 – 50 UA/kg)

Propriété	Résultat
Produits de formulation	Tous les produits de formulation du Sylvanex sont considérés comme étant relativement non toxiques (c.-à-d. qu'ils figurent aux listes 4A ou 4B des matières inertes de la United States Environmental Protection Agency [EPA]). Le produit ne contient aucun produit de formulation figurant sur la liste 1 des matières inertes de l'EPA et aucun produit connu comme étant une substance de la voie 1 de la PGST.
Densité	180 kg/m^3
pH dans l'eau distillée	6 – 7
Corrosivité	Non irritant pour la peau; légèrement irritant pour les yeux
Mouillabilité	Suspension facile lorsqu'agité par vortex
Teneur en eau	1 - 3 %

1.3 Détails relatifs aux utilisations et renseignements supplémentaires

Le Sylvanex est une PC qui se présente sous forme de poudre mouillable et qui contient la matière active, soit la souche D97 du champignon *Ophiostoma piliferum*, que le demandeur propose d'utiliser comme produit biologique antitache colorée de l'aubier sur le pin tordu et le pin rouge fraîchement abattus, au point de chute seulement. Le Sylvanex doit être dilué dans l'eau et pulvérisé pendant la coupe du bois, en se servant d'un système hydraulique de pulvérisation attaché au matériel d'abattage. Il n'existe présentement pas de produit antitache colorée de l'aubier homologué pour le profil d'emploi proposé par le demandeur.

Le champignon *Ophiostoma piliferum* a été isolé en Europe, en Australie, aux États-Unis et au Canada. Aux États-Unis, *Ophiostoma piliferum* est ubiquiste sur les bois résineux (Hunt, 1956) et on mentionne qu'il est un des plus importants champignons colorant le bois dans les États du Sud (Verrall, 1939). Au Canada, *Ophiostoma piliferum* est indigène à un certain nombre d'écozones : on l'a retrouvé sur le bois et les billes de pin tordu, d'épinette blanche, de pin gris et d'épinette noire en Colombie-Britannique, en Alberta, en Saskatchewan, en Ontario et au Québec (Uzunovic et coll., 1999).

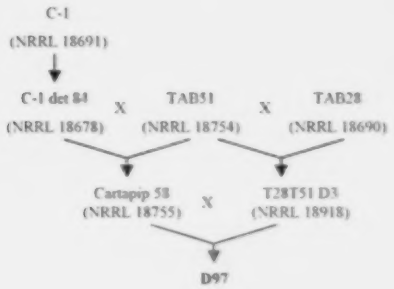
Ophiostoma piliferum est un champignon saprophyte, colonisateur primaire de l'aubier frais des arbres coupés et des billes. Le champignon colonise seulement les matières ligneuses mortes et il préfère les bois mous aux bois durs. Les souches pigmentées de type sauvage de ce champignon causent la décoloration de l'aubier.

On a obtenu la souche D97 du champignon *Ophiostoma piliferum* par croisement de souches de type sauvage d'*Ophiostoma piliferum* (figure 1.3.1), notamment de la souche de type sauvage C-1 gris pâle d'*Ophiostoma piliferum*. On a obtenu les homocaryons à partir de la souche C-1 en isolant les ascospores à spore unique. Les ascospores ont germé, donnant lieu à des colonies de cellules fongiques individuelles que l'on a triées à vue. De ces cellules, on a choisi l'isolat blanc ou incolore, C-1 det 84, pour les croisements ultérieurs.

Les souches à pigments foncés (noirs) comme les souches TAB51 et TAB28 sont associées à une colonisation rapide de l'aubier et on les utilise dans les croisements avec des souches incolores pour produire des cellules fongiques qui sont incolores tout en étant de croissance rapide. On a donc croisé l'isolat C-1 det 84 avec la souche pigmentée de type sauvage TAB51. Des colonies obtenues, on a sélectionné le Cartapip 58 en vue de croisements ultérieurs, d'après son absence de couleur et ses caractéristiques de croissance.

De façon similaire, on a obtenu une variante brun pâle, le T28T51 D3, un isolat d'ascospores uniques résultant du croisement de deux souches de type sauvage, TAB28 et TAB51. Le croisement final entre le T28T51 D3 et le Cartapip 58 a donné la souche d'ascospores uniques incolores D97, utilisée dans le Sylvanex. On a choisi la souche D97 comme matière active du Sylvanex en fonction de sa croissance sur les essences forestières telles que le pin, de sa couleur blanche ou son absence de couleur et de sa capacité à dégrader la poix.

Figure 1.3.1 Arbre généalogique de la souche D97 du champignon *Ophiostoma piliferum*



La souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* diffère de la plupart des autres souches de cette espèce car les parois cellulaires ne contiennent pas de mélanine; c'est ce qui lui confère sa qualité incolore. Le demandeur propose d'utiliser le Sylvanex pour lutter contre les champignons causant le bleuissement et prévenir la coloration de l'aubier. La souche blanche ou incolore dans le Sylvanex entre en compétition avec les champignons pigmentés pour l'accès aux sources limitées de substances nutritives dans le bois fraîchement coupé. Le niveau naturel de champignons causant le bleuissement ne peut s'accroître et dominer la concentration élevée de la souche albinos pulvérisée sur le bois.

Dans toutes les études sur l'innocuité et les effets sur la santé humaine, on a utilisé le C-1 det 5, un autre isolat d'ascospore uniques incolores de la souche C-1 d'*Ophiostoma piliferum*, tandis que le Cartapip 58 s'est avéré la substance à l'essai dans la plupart des études de toxicologie environnementale. Comme il ne semble pas y avoir de sous-espèces ou de variétés au sein de cette espèce, on peut considérer le C-1 det 5, le Cartapip 58 et le Cartapip 97 comme biologiquement équivalents.

Environnement Canada et Santé Canada ont évalué cet agent de lutte en 1988 et l'ont jugé acceptable, non comme pesticide mais comme agent de contrôle de la poix dans les copeaux de bois, pour l'industrie des pâtes et papiers. (Déclaration de substance nouvelle n° 6858).

2.0 Méthodes d'analyse

2.1 Méthode d'analyse de la matière active telle que fabriquée

2.1.1 Méthodes d'identification des microorganismes

Il est possible de distinguer le genre *Ophiostoma* des organismes apparentés du genre *Ceratocystis* d'après leur morphologie (p. ex., les ascocarpes, les hyphes, les conidiophores). La sensibilité à l'antibiotique cycloheximide peut aussi permettre de distinguer le genre *Ceratocystis* du genre *Ophiostoma* : on a constaté une croissance linéaire blanche d'*Ophiostoma piliferum* sur de la gélose extrait de malt à laquelle on a ajouté des concentrations de cycloheximide allant jusqu'à 1000 ppm, tandis qu'aucune espèce de *Ceratocystis* ne s'est développée sur de la gélose extrait de malt avec > 50 ppm de cycloheximide (Harrington, 1981).

Les patrons de polymorphisme de restriction (RFLP) produits par la digestion du gène 26S rARN par des enzymes de restriction de l'ADN de type *Hae*III peuvent aussi servir à distinguer *Ophiostoma piliferum* des autres espèces d'*Ophiostoma* colorant le bois.

L'amplification du gène de la β-tubuline avec une paire d'amorces spécifiquement désignées (Cat1–Cat2) permet de distinguer la souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* de la plupart des autres souches d'*Ophiostoma piliferum*. La souche D97, outre les souches en provenance du Québec, de la Saskatchewan et des États-Unis, donne un fragment d'ADN de 180 paires de base, tandis que les souches provenant d'Europe, de Nouvelle-Zélande, de Colombie-Britannique et d'Alberta ne produisent pas ce fragment. Le recours à une culture mère d'ensemencement permanente pour tous les lots de production de Sylvanex, ainsi que d'autres propriétés spécifiques à la souche D97 (comme son absence de couleur), atténue les préoccupations associées à la distinction de la souche D97 des souches naturelles ou de type sauvage d'*Ophiostoma piliferum*.

2.1.2 Méthodes de détermination de la pureté des cultures d'ensemencement

La société AgraSol Inc. entrepose la culture mère d'ensemencement de la souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* utilisée dans la production du Sylvanex dans des flacons à -70 °C, gardés dans ses laboratoires de Raleigh (État de la Caroline du Nord). La culture mère est également déposée dans la collection de cultures du Northern Regional Research Laboratory (NRRL) du United States Department of Agriculture (USDA) (NRRL nº 18917).

La préparation des flacons de production débute par l'inoculation, sous conditions aseptiques, d'une fiole de 250 mL contenant 100 mL d'extrait de levure et de malt (20 g/L extrait de malt, 2 g/L extrait de levure) avec 1 mL de souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* congelée, provenant de la culture mère. On procède ensuite à l'incubation de ce flacon sur un agitateur réglé à 120 tours par minute, à 28 °C pendant 24 heures. On transfère ensuite le contenu de la fiole dans une fiole de 2 L contenant 900 mL d'extrait de levure et de malt et on l'incube à nouveau sur l'agitateur pour une période de 24 à 48 heures. On met fin à l'incubation lorsqu'il y a sporulation, confirmée par microscopie optique. Cultivé de cette manière, le produit de fermentation contient de 60 à 70 % de blastospores.

On ajoute du glycérol stérilisé au produit de fermentation jusqu'à une concentration finale de 20 % v/v et on transfère le mélange de façon aseptique dans des flacons stériles de cryoconservation de 1 mL que l'on entrepose à -70 °C. On assigne un code à chaque lot de production pour des fins de traçage pendant les étapes d'assurance de la qualité et de la production de l'inoculum.

On examine les cultures de production pour vérifier la présence d'albinisme et de croissance microbienne avant de les utiliser comme inoculum pour la production de Sylvanex. Pour la vérification de l'albinisme, on prend des échantillons d'au moins deux flacons que l'on dilue et étale sur des plaques de gélose dextrosée à la pomme de terre (PDA) que l'on incube ensuite à 28 °C pendant 96 heures. Le lot des flacons de production passe le test d'albinisme uniquement si, sur 1000 colonies examinées, on ne retrouve aucune colonie pigmentée. On ne procède à aucun autre test pour vérifier l'intégrité ou la constance de la souche.

Pour vérifier la présence de microbes indésirables, on prend un échantillon d'au moins 10^8 CFU de la souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* que l'on fait croître sur des plaques de gélose de PDA ou de gélose de Luria. Ces plaques sont incubées à 37 °C, température qui ne permet pas la croissance d'*Ophiostoma piliferum*. Après 24, 48, 72 et 96 heures, on examine les plaques pour y vérifier la présence de colonies de bactéries, champignons ou levures. Le lot de flacons de production passe le test de microbes indésirables si l'on n'observe aucune colonie sur aucune des plaques de gélose de PDA ou de Luria.

2.1.3 Méthodes de détermination du contenu en microorganismes dans le produit obtenu en vue de la fabrication de la formulation

Deux méthodes servent à vérifier la viabilité de la bouillie intermédiaire de spores. La première méthode met en jeu un distributeur de plaques giratoire spécialisé qui distribue 50 µL d'échantillon dilué (quatre dilutions) sur la surface d'une plaque rotative de PDA de 10 cm, du centre vers la bordure en quantité décroissante, de façon telle que le volume d'échantillon dans chaque portion de la plaque est connu. On incube ces plaques à 32 °C pendant 60 – 65 heures et on effectue ensuite les numérations totales. On prend trois lectures de numérations totales pour chaque plaque. On fait ensuite la moyenne des 12 résultats des numérations totales en vue de déterminer l'indice final. On peut également choisir la méthode normalisée d'étalement sur plaques. Pour ce faire, on étale les dilutions de la bouillie sur des plaques de gélose de PDA en réplicats de cinq plaques par dilution, et on les incube à l'envers, à 25 °C, pendant trois ou quatre jours. Seules les plaques comptant de 25 – 200 colonies sont incluses dans la détermination de l'indice total. La bouillie intermédiaire est jugée acceptable si le nombre des cellules par plaque est d'au moins 5×10^9 CFU/g. La bouillie intermédiaire contient généralement près de 2×10^{10} CFU/g.

Après le séchage, on procède à nouveau à la vérification de la viabilité du produit à l'aide de la méthode normalisée d'étalement sur plaques. On prépare l'échantillon en hydratant 5 g de Sylvanex dans 100 mL d'eau à 25 °C et à pH 5 – 6, en brassant ou agitant pendant 30 minutes. On prépare cinq réplicats du Sylvanex hydraté, on les dilue en série et on applique 100 µL de chaque dilution (habituellement les dilutions 10^5, 10^6, 10^7 et 10^8) sur une plaque de gélose de PDA. Les plaques sont mise en incubation, à l'envers, à 25 °C, pendant trois ou quatre jours. Les plaques contenant de 25 à 200 colonies sont prises en compte et les résultats sont exprimés en termes de CFU/mL et d'UA/kg. On définit une UA comme étant équivalente à 10^{12} CFU. Les données d'efficacité suggèrent que l'on peut accroître les limites d'activité à 30 – 50 UA/kg. La nature du procédé de fabrication peut donner lieu à une gamme étendue d'activité d'un lot à un autre. Le demandeur propose de fournir au consommateur le nombre total d'UA par carton d'expédition avec le poids net de chaque carton. L'utilisateur peut alors calculer les UA/kg du contenu de chaque carton d'expédition et déterminer la quantité de produit à pulvériser. Cette proposition est acceptable. Le demandeur devra remplir un nouveau formulaire des spécifications du produit indiquant les limites imposées sur la garantie pour la PC.

2.1.4 Méthodes de détermination des impuretés pertinentes dans le produit fabriqué

Pour s'assurer qu'aucune colonie n'est pigmentée, on incube les plaques provenant des essais d'activité du Sylvanex pendant six à sept jours additionnels.

Le demandeur a procédé aux essais de vérification de la présence de salmonelles, de *Staphylococcus aureus*, de coliformes totaux, de coliformes fécaux, de levures et de moisissures, et de streptocoques fécaux selon des lignes directrices reconnues (AOAC, FDA, American Public Health Association). Il a présenté les données de contrôle de

qualité provenant de cinq lots de Sylvanex. Tous ces lots ont eu des résultats négatifs en ce qui concerne les salmonelles (/10 g) et *Staphylococcus aureus* (/1g). L'indice le plus élevé, pour tous les genres de microorganismes indésirables, concernait les streptocoques fécaux : on en a retrouvé $1{,}15 \times 10^4$ CFU/g dans un lot mais cette valeur se situe sous la limite établie de 10^5 CFU/g pour d'autres produits antiparasitaires microbiens. Des indices totaux de coliformes pour deux lots se situaient entre 2,2 et $6{,}6 \times 10^3$ CFU/g, excédant ainsi la limite de 10^3 CFU/g établie pour d'autres produits antiparasitaires microbiens. Les colonies représentatives des coliformes fécaux isolées à partir de ces deux lots ont été identifiées comme étant *Enterobacter* sp., *Proteus mirabilis* et *Klebsiella pneumoniae*. Il est essentiel de poursuivre la surveillance des microcontaminants microbiens dans tous les lots de production de Sylvanex et tout lot qui excède les limites établies en ce qui a trait aux contaminants microbiens doit être détruit.

Le Sylvanex est fabriqué dans une installation où l'on produit également un certain nombre de produits à base de sous-espèces de *Bacillus*, principalement les produits contenant du *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* (Btk). Le Btk est un agent microbien de lutte antiparasitaire (AMLA) homologué très spécifique pour la lutte contre les lépidoptères nuisibles. Le risque que présente le Btk pour les humains et les animaux est minime. Dans l'usine de fabrication, il existe toutefois une possibilité de contamination du Sylvanex par les spores du Btk. Le demandeur d'homologation allègue que la plage des résidus prévus de spores de Btk dans le Sylvanex est de 1×10^3 CFU/g.

Le champignon *Ophiostoma piliferum*, à ce que l'on sache, ne produit pas de substance toxique pour les mammifères. Cette absence de toxicité pour les mammifères est appuyée par l'absence de rapports sur des effets nocifs chez les humains ou les animaux, malgré la nature ubiquiste d'*Ophiostoma piliferum* dans un certain nombre d'écozones au Canada.

2.1.5 Méthodes utilisées pour montrer l'absence de pathogènes humains ou mammifères

Tel que mentionné à la section 2.1.4, le programme d'assurance de la qualité de la production du Sylvanex doit inclure la destruction des lots qui excèdent les limites établies pour certains contaminants microbiens.

2.1.6 Méthodes utilisées pour déterminer la stabilité à l'entreposage et la durée de vie du microorganisme

Le demandeur a déterminé la stabilité du produit à différents moments après son entreposage à -20 °C. Pour ce faire, il s'est servi de la méthode normalisée d'étalement sur plaques pour les essais de viabilité, décrite à la section 2.1.3. Les données de stabilité à l'entreposage soumises pour le Sylvanex avaient peu de valeur parce que la fabrication et les essais ont eu lieu dans un certain nombre d'endroits différents et parce que seuls deux lots ont été testés dans le temps. Les causes de la variabilité de l'activité résiduelle n'étaient pas claires, à savoir la nature de l'essai, l'endroit de fabrication du lot, l'endroit de l'essai (dans certains cas l'activité initiale était évaluée dans un endroit et la deuxième évaluation se faisait dans un autre endroit) ou encore les différences dans la stabilité entre

divers lots. D'après les données limitées soumises par le demandeur, l'ARLA ne peut seulement soutenir la période d'entreposage de 18 mois à -20 °C. Le demandeur devra retirer de l'étiquette la mention d'un entreposage à température ambiante pour une période de quelques semaines. Il devra soumettre des données additionnelles sur la stabilité s'il souhaite modifier l'étiquette et y ajouter des températures supérieures d'entreposage. De telles données doivent inclure des échantillons analysés périodiquement sur une période de temps appropriée et provenant de lots entreposés sous les conditions d'exploitation prévues (p. ex., 25 °C). Le demandeur devrait également envisager d'évaluer la stabilité à d'autres températures d'entreposage. Afin de minimiser la variabilité, on recommande d'ajouter au protocole une étape d'homogénéisation visant à déterminer l'efficacité du produit.

2.2 Méthode d'analyse de la formulation

Le Sylvanex n'est pas destiné à être utilisé sur les aliments destinés aux humains ou aux animaux. Il n'est donc pas nécessaire de déterminer une limite maximale de résidus (LMR) pour la souche D97 du champignon *Ophiostoma piliferum*. Par conséquent, l'ARLA n'exige pas la présentation d'une méthode pour quantifier les résidus de la souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* dans les aliments destinés aux humains ou aux animaux.

3.0 Effets sur la santé humaine ou animale

Voir le tableau sommaire au tableau 1 de l'annexe I.

3.1 Sommaire intégré de la toxicité et de l'infectiosité

En ce qui a trait à l'innocuité et à la santé humaine, l'ARLA a examiné les renseignements et les données soumises par AgraSol Inc. en appui à la demande d'homologation de la souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* et du Sylvanex et les a jugés suffisamment complets pour permettre une décision relative à l'homologation. Les renseignements fournis pour caractériser la matière active, le procédé de fabrication et le contrôle de la qualité ont bien cerné les préoccupations potentielles relatives à l'innocuité et à la santé humaine associées à la souche D97 du champignon *Ophiostoma piliferum* et aux contaminants bactériens et fongiques introduits pendant la production.

L'Agence a examiné les études de toxicité aiguë et d'infectiosité soumises en appui à l'homologation de la souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* (Sylvanex technique) et du Sylvanex. La série de données comprenait des études effectuées sur une souche très apparentée, la C-1 det 5 (voir la section 1.3); des études acceptables sur la pathogénicité/toxicité pulmonaire et orale; une étude supplémentaire sur la toxicité/pathogénicité cutanée contenant suffisamment de données pour prendre une décision relative à l'irritation cutanée primaire; et une étude additionnelle sur l'irritation oculaire.

On n'a observé aucun signe de toxicité ou de pathogénicité lors de l'administration de la souche C-1 det 5 d'*Ophiostoma piliferum* à des rats par voie orale ou par voie intratrachéale. La souche C-1 det 5 n'a pas causé d'irritation lors de l'application cutanée sur des lapins mais les résultats sur la toxicité ne sont pas déterminants, car les doses utilisées n'étaient pas conformes à celles exigées dans les lignes directrices pour les essais de toxicité cutanée. Compte tenu de cette incertitude, les utilisateurs du produit devront utiliser de l'équipement de protection individuelle (EPI) pour se protéger de l'exposition cutanée et le demandeur devra soumettre une nouvelle étude de toxicité cutanée à l'aide de la PC, à la dose requise, pour compléter l'évaluation relative à la santé et à l'innocuité. On a constaté une légère rougeur de la conjonctive après administration de la souche C-1 det5 dans les yeux de lapins. On s'attend à ce que le potentiel irritant du Sylvanex soit supérieur à celui de la substance utilisée dans cet essai compte tenu des propriétés physiques de la formulation en poudre. Des énoncés d'étiquette normalisés seront requis pour atténuer les risques pour les yeux. Le champignon *Ophiostoma piliferum* ne produit aucune toxine connue pour les mammifères. Cette constatation a été confirmée par une lettre d'un chercheur expert dans le domaine des champignons ophiostomatoïdes qui, après avoir effectué des recherches de documentation extensives sur le champignon *Ophiostoma piliferum* et ses métabolites, déclare qu'à sa connaissance, *Ophiostoma piliferum* ne produit pas de toxines ou d'antibiotiques.

3.2 Incidence d'hypersensibilité

L'industrie canadienne des pâtes et papiers utilise le Sylvanex depuis 1995 comme agent réducteur de poix. On ne signale aucune incident d'hypersensibilité associé à la fabrication, la formulation et l'application du Sylvanex à cette fin. Toutefois, et il en est de même pour tous les microorganismes, on considère qu'*Ophiostoma piliferum* est un agent potentiellement sensibilisant.

3.3 Effets sur la santé humaine ou animale découlant de l'exposition à la matière active ou aux impuretés qu'elle contient

3.3.1 Évaluation de l'exposition professionnelle et occasionnelle

L'examen des études sur l'innocuité et la santé humaine révèle que le Sylvanex (souche D97 d'*Ophiostoma piliferum*) est de faible toxicité aiguë, n'est pas pathogène par gavage oral et par instillation intratrachéale. Comme tous les pesticides microbiens, on considère qu'*Ophiostoma piliferum* est un sensibilisant potentiel, bien qu'il n'y ait pas de rapport d'hypersensibilité. Une étude d'irritation oculaire aiguë a montré qu'*Ophiostoma piliferum* était minimalement irritant pour les yeux sous forme de suspension mais son potentiel d'irritation sous forme de poudre demeure inconnu. En outre, l'industrie des pâtes et papiers utilise ce produit comme agent de contrôle de la poix depuis 1995 et depuis, aucune préoccupation relative à la santé humaine ou à l'innocuité n'a été soulevée.

Le demandeur propose d'utiliser la souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* comme produit antitache colorée de l'aubier sur le pin tordu et le pin rouge fraîchement abattus; le produit serait pulvérisé au taux de 10^{11} CFU (100 – 300 g) par m^3 à l'aide d'un pulvérisateur attaché à la pièce coupante de l'abatteuse-empileuse, de l'ébrancheuse ou de l'abatteuse-tronçonneuse. L'exposition professionnelle pourrait survenir pendant le mélange du produit, lors du chargement dans la cuve de pulvérisation et lors de la dérive de pulvérisation issue de l'abatteuse. Cependant, les opérateurs de machinerie sont protégés de la dérive dans une cabine fermée. D'après les propriétés biologiques, l'absence de toxicité et de pathogénicité du produit ainsi que le mode d'emploi proposé, l'Agence recommande d'ajouter à l'étiquette du produit l'utilisation d'un EPI normalisé.

4.0 Résidus

4.1 Sommaire des résidus

Le Sylvanex ne sera pas utilisé sur les aliments destinés aux humains ou aux animaux. Il n'est donc pas nécessaire d'établir de LMR pour la souche D97 du champignon *Ophiostoma piliferum* en vertu de l'article 4(d) de la *Loi sur les aliments et drogues* (adultération des aliments) et tel que défini à l'alinéa 15, section B.15.002 du *Règlement sur les aliments et drogues*. Le champignon *Ophiostoma piliferum* est un microorganisme ubiquiste, largement répandu dans l'environnement. On n'en connaît pas l'existence en tant que champignon aquatique et on ne s'attend donc pas à ce qu'il prolifère dans les milieux aquatiques. En outre, on estime que le risque découlant de l'exposition occasionnelle au produit est minime, car il n'y a pas de preuve d'effet nocif résultant de l'exposition orale, cutanée ou respiratoire. Ainsi, la surveillance d'*Ophiostoma piliferum* dans l'eau potable comme indicateur d'une contamination microbienne ou en tant que contaminant pathogène direct n'est pas nécessaire. La percolation dans le sol et le traitement municipal de l'eau potable réduisent la possibilité d'exposition à la souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* dans l'eau potable. Par conséquent, le potentiel de transfert significatif dans l'eau potable est de minime à nul et le risque de consommation d'eau potable contenant la souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* est minime puisqu'il n'y a pas de signe d'effet nocif des suites de l'exposition orale à cette matière.

5.0 Comportement et devenir dans l'environnement

Il n'a pas été nécessaire d'obtenir des données sur le devenir dans l'environnement (niveau II) car on ne prévoit pas que l'utilisation proposée de la souche D97 du champignon *Ophiostoma piliferum* ait des effets nocifs sur les organismes non visés.

6.0 Effets sur les organismes non visés

Voir les sommaires aux tableaux 1 et 2 de l'annexe II.

6.1 Sommaire intégré de la toxicologie environnementale

Le champignon *Ophiostoma piliferum* est un des plus importants champignons colorant le bois résineux dans les États du Sud (Verrall, 1939) et on le dit largement répandu dans les bois résineux d'Europe. Au Canada, on a retrouvé *Ophiostoma piliferum* sur le bois et les billes de diverses espèces de pin et d'épinette provenant de nombreuses écozones. La documentation publiée concernant ce champignon indique qu'il s'agit d'un saprophyte du bois mort ou du bois dont les mécanismes de résistance sont gravement affaiblis. Il peut coloniser les bois durs comme les bois mous, mais ces derniers sont considérés comme son substrat préféré. *Ophiostoma piliferum* et d'autres champignons colorant l'aubier sont intimement liés à la présence des scolytes. En effet, ces insectes sont vecteurs de ces pathogènes; ils transportent les spores des champignons colorant l'aubier tant sur la surface extérieure de leur corps qu'à l'intérieur, dans leur tractus intestinal. Certaines espèces de scolytes possèdent un organe spécialisé appelé mycangium qui sert à transporter les spores fongiques.

Le champignon *Ophiostoma piliferum* est capable de métaboliser les composants de la poix, soit des triglycérides, des acides gras et des acides résiniques diterpènoïdes, des stérols et des cires. Selon la documentation publiée, il ne produit pas d'enzymes cellulolytiques ou ligninolytiques Habituellement, la croissance des champignons provoque une coloration superficielle du bois. Cette coloration est causée par les hyphes à pigments foncés du champignon colorant l'aubier. Dans la souche D97 d'*Ophiostoma pilferum*, aucune coloration n'a lieu car les pigments qui tachent le bois ne sont pas produits, c.-à-d. qu'il s'agit d'une souche sans pigment ou albinos. La synthèse des pigments est bloquée dans la voie de synthèse de la 1,8-dihydroxynaphthalène mélanine. La souche D97 d'*Ophiostoma pilferum* ne détruit pas les autres champignons colorant l'aubier. Elle entre plutôt en compétition avec les autres champignons en ce qui a trait à l'accès aux sucres rapidement métabolisés associés à l'aubier frais. Une fois la niche occupée et les substances nutritives monopolisées, il n'y a pas de colonisation ultérieure par d'autres champignons colorant l'aubier. On ne considère pas *Ophiostoma piliferum* comme un pathogène et le champignon n'est pas capable de parasiter ni les végétaux ni les animaux. On ne signale aucun effet nocif chez les oiseaux, les mammifères sauvages, les poissons, les arthropodes, les invertébrés non-arthropodes, les microorganismes et les plantes dans la documentation publiée. En outre, on n'a relevé aucun effet manifeste de toxicité ou de pathogénicité dans aucune des études de toxicité environnementale soumises à l'examen.

Selon le mode d'emploi proposé, le Sylvanex sera pulvérisé sur le pin tordu et le pin rouge au point de chute, à l'aide d'un système hydraulique de pulvérisation attaché aux divers équipements servant à couper et débrancher. Il s'ensuit un potentiel élevé d'exposition des organismes terrestres non visés. Cependant, on s'attend à ce que le

risque encouru par ces espèces non visées soit faible d'après les résultats des études soumises et à cause de l'absence d'effet nocif dont on fait état dans la documentation publiée. Conséquemment, la souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* devrait poser peu de risque à l'environnement lorsqu'utilisé selon le mode d'emploi prescrit par l'étiquette. De plus, les produits de formulation dans la PC ne posent pas de risque environnemental lorsque la PC est utilisée aux doses d'application prescrites.

7.0 Efficacité

7.1 Efficacité

7.1.1 Utilisation proposée

Le Sylvanex est une PC sous forme de flocons contenant la matière active, la souche D97 du champignon *Ophiostoma piliferum*. Le demandeur en propose l'utilisation en tant que produit biologique antitache colorée de l'aubier sur le pin tordu et le pin rouge fraîchement abattus, au point de chute seulement. Le Sylvanex doit être dilué dans l'eau et pulvérisé pendant la récolte du bois à l'aide d'un système de pulvérisation hydraulique attaché à l'équipement de récolte du bois. Il n'existe aucun produit antitache colorée de l'aubier actuellement homologué pour ce profil d'emploi.

7.1.2 Mode d'action

Le Sylvanex contient des blastospores d'une souche albinos (non pigmentée) du champignon colorant de l'aubier *Ophiostoma piliferum*. Les isolats incolores se retrouvent naturellement dans les forêts ou les produits du bois mais ils passent inaperçus, car on ne les retrouve pas en abondance, leur manque de mélanine les rendant inaptes à la survie en nature à long terme. La mélanine s'avère essentielle pour la protection contre les rayons ultraviolets de la lumière, le développement des périthèces et la protection contre les acariens et insectes prédateurs. La coloration du bois typiquement associée avec la croissance d'*Ophiostoma piliferum* n'a pas lieu avec le Sylvanex, car la souche D97 est bloquée dans la voie de synthèse de la 1,8-dihydroxynaphthalène mélanine.

Le principe en jeu dans l'utilisation du Sylvanex est la compétition entre la souche albinos et les champignons pigmentés de type sauvage pour les ressources nutritives limitées présentes dans le bois mort ou presque mort. Comme on pulvérise le Sylvanex à des concentrations élevées tout de suite après l'abattage, la souche albinos est la première à coloniser l'aubier frais. Elle peut facilement assimiler les substances nutritives de l'aubier avant que les autres champignons causant le bleuissement de l'aubier et présents à des niveaux naturels faibles aient la possibilité de s'établir. Une fois les ressources nutritives capturées et la niche occupée, la colonisation subséquente par les champignons de type sauvage n'a pas lieu.

7.1.3 Nature du problème parasitaire

La tache colorée de l'aubier est une coloration grise, noire ou bleuâtre de l'aubier causée par la présence de levures noires, de moisissures foncées et de champignons causant le bleuissement. Cette coloration du bois réduit de façon importante la qualité esthétique et la valeur commerciale du bois, mais n'a pas d'effet sur la résistance du bois. La coloration superficielle du bois par ces champignons est attribuable aux hyphes contenant des pigments foncés. Il n'y a pas de vraie tache des parois des cellules du bois.

Les champignons causant le bleuissement qui sont ubiquistes au Canada sont : *Aureobasidium pullulans*, *Ceratocystis adiposa*, *Ceratocystis coerulescens*, *Ophiostoma flexuosum*, *Ophiostoma floccosum*, *Ophiostoma ips*, *Ophiostoma minus*, *Ophiostoma piceae*, *Ophiostoma piceaperdum*, *Ophiostoma piliferum* et *Phacidium coniferarum*.

Les spores des champignons colorant l'aubier sont distribués principalement par les insectes, mais peuvent également l'être par le vent et la pluie et par les opérations forestières pendant la récolte et le façonnage du bois. Les scolytes peuvent introduire les champignons causant le bleuissement à travers l'écorce des billes. L'air sec n'est pas propice à la dispersion des conidies, mais l'air empreint de bruine et l'éclaboussement des gouttelettes d'eau pourraient déloger et disséminer les conidies plutôt facilement.

7.1.4 Efficacité contre les organismes nuisibles

Le demandeur a procédé à des essais d'efficacité en 2000 dans la vallée de la rivière Skookumchuck en Colombie-Britannique de même qu'en 2000 et 2001 dans la vallée des rivières Elk et Brazeau en Alberta.

Les chercheurs ont procédé à l'abattage des pins tordus à ces sites et à l'ébranchage à l'aide d'équipement mécanique. L'opération a causé un niveau modéré de dommages à l'écorce. Ils ont choisi des billes d'essai d'une longueur de trois à cinq mètres, libres de champignons causant le bleuissement et libres de dommages causés par les scolytes.

Ils ont pulvérisé la surface entière de chaque bille à saturation avec la suspension de Sylvanex (540 mL de suspension de Sylvanex par mètre carré de surface de bois) à l'aide d'un pulvérisateur dorsal muni d'une buse à jet plat. De la même manière, ils ont pulvérisé de l'eau sur les billes témoins, non traitées. Après la pulvérisation, ils ont empilé les billes de l'essai sur des traverses et les ont recouverts d'une couche de billes. Ces billes sont utilisées pour compenser la petite taille des piles expérimentales. Les températures à l'intérieur de ces piles de billets sont inférieures à la température de l'air ambiant pendant les journées chaudes à cause de l'effet refroidissant de l'humidité s'évaporant du bois qui sèche. L'effet de refroidissement étant limité par la petite taille des piles, les chercheurs ont ajouté des billes en couverture. En 2000, ils ont procédé à chaque traitement sur trois piles de 10 billes et en 2001 sur deux piles de 20 billes.

Six semaines après le traitement, ils ont retiré les billes de couverture et ont choisi, aléatoirement, les billes d'essai de chacune des piles. Ils ont recouvert les autres billes avec les billes protectrices et ont procédé à un autre échantillonnage après six autres semaines d'entreposage. Ils ont prélevé des disques de cinquante millimètres d'épaisseur le long de chaque bille. Ils ont aussi prélevé des disques additionnels afin de déterminer la teneur en humidité. Ils ont évalué l'étendue de la colonisation des champignons causant le bleuissement en estimant la surface du disque ayant une coloration visible, à l'aide d'un gabarit transparent (grille avec des unités de 2,5 × 2,5 mm). Ils ont mesuré le diamètre de l'aubier et du bois de coeur et ont exprimé la quantité de tache en terme de pourcentage de surface d'aubier de chaque disque.

Résultats des taches — Essais de 2000 effectués en Alberta

Traitement	**Surface moyenne de l'aubier affectée par la tache colorée de l'aubier (%)**	
	1er échantillonnage (10 août 2000)	**2e échantillonnage (19 sept. 2000)**
Contrôle (eau)	Négligeable	11,41 ± 15,47
5×10^7 CFU/mL de Sylvanex	Négligeable	1,54 ± 3,28*
$1,5 \times 10^7$ CFU/mL de Sylvanex	Négligeable	10,62 ± 12,18

* Statistiquement différent du contrôle ($p < 0,05$)

Le niveau négligeable constaté de tache colorée de l'aubier lors des premiers échantillonnages faits en Alberta et en Colombie-Britannique (six semaines après traitement) était négligeable. La température sèche aurait fait sécher les billes rapidement, prévenant la croissance fongique. Le rapport mentionne que la teneur en humidité de l'aubier des billes était trop faible pour soutenir la croissance des champignons causant le bleuissement. L'analyse statistique (ANOVA) a démontré qu'il n'y avait pas de différence statistique entre les billes traitées et non traitées.

Les chercheurs ont observé la présence de tache colorée de l'aubier lors du deuxième échantillonnage effectué en Alberta (13 semaines après traitement). Le deuxième échantillonnage en Colombie-Britannique n'a pas eu lieu, pour des raisons inconnues. L'analyse statistique (ANOVA) des données a révélé qu'il y avait significativement moins de tache sur l'aubier des billes traitées avec la concentration maximale de Sylvanex que sur celui des billes témoins ($p < 0,05$). À la dose minimale de Sylvanex, les taches de l'aubier du bois traité n'étaient pas différentes de celles de l'aubier du bois non traité.

Les résultats de ces essais ne démontrent pas clairement l'efficacité du Sylvanex, peut-être à cause de l'absence de pression du pathogène. Comme le Sylvanex requiert les mêmes conditions que les champignons de type sauvage pour croître, on ne s'attend pas à ce qu'il donne de bons résultats dans des conditions qui ne sont pas favorables au développement de l'organisme nuisible.

Résultats des taches — Essais de 2001 effectués en Alberta

Traitement	**Surface moyenne de l'aubier affectée par la tache colorée de l'aubier (%)**	
	6 semaines	**13 semaines**
Contrôle (eau)	32,4 ± 17,7	64,4 ± 19,75
Sylvanex (5×10^7 CFU/mL)	0,9 ± 2,1	27,39 ± 23,8

L'essai de 2001 comportait des piles de billes plus grosses que celles des premiers essais, ce qui représente mieux les conditions normales de récolte du bois, où les billes sont moins susceptibles de sécher rapidement. Seule la suspension à la concentration maximale a fait l'objet d'essais (5×10^7 CFU/mL). La pression du pathogène était supérieure en 2001 qu'en 2000, car les disques provenant des billes témoins avaient un pourcentage supérieur de leur surface tachée. L'analyse statistique des données de 2001 a indiqué que les billes traitées avec le Sylvanex avaient significativement moins de taches que les billes témoins. Les billes traitées étaient essentiellement sans tache après les six premières semaines et avaient moins de la moitié de taches que les billes non traitées après 13 semaines.

Il n'est pas possible de comparer l'efficacité du Sylvanex par rapport à une norme de rendement établie, car ces normes n'ont pas été élaborées pour les produits antitache colorée de l'aubier utilisés sur les billes. On ne s'attend pas à ce que le Sylvanex réponde aux normes commerciales sévères pour les produits antitache colorée de l'aubier utilisés sur le bois pour une durée de protection de six mois, car les données montrent un niveau trop élevé de taches sur les billes traitées. Il n'est pas possible de comparer le Sylvanex à un autre produit homologué, car il n'y a actuellement pas de produit de remplacement pour utilisation sur les billes. Bien que le traitement au Sylvanex n'ait pas fourni le même degré d'efficacité dans tous les essais soumis, les résultats ont montré une amélioration par rapport aux billes non traitées. On ne s'attend pas à ce que l'efficacité du Sylvanex contre la tache colorée de l'aubier soit constante, car le dommage varie d'une année à l'autre et la croissance fongique est dépendante des conditions environnementales. Les résultats ont montré une réduction statistiquement significative de la tache sur une période de 13 semaines. Comme les billes sont traitées dès que possible pour éviter la coloration de l'aubier, la période de protection de 13 semaines conférée par le Sylvanex devrait s'avérer adéquate dans la majorité des cas. Il faut souligner qu'on ne prévoit pas

qu'un traitement additionnel après la période de 13 semaines fasse une différence, car à ce moment là, les champignons auront consommé la plupart des substances nutritives.

Les données d'efficacité ne portaient que sur le pin tordu. Le demandeur a cependant fourni des articles publiés indiquant que le Sylvanex réduisait la colonisation des champignons colorant de l'aubier sur le tremble (*Populus tremuloides*) et le pin rouge (*Pinus resinosa*), mais ces articles ne faisaient pas état du pourcentage de réduction de la surface tachée. Bien que l'article de Uzunovic et coll. (1999) mentionne que *Ophiostoma piliferum* a été isolé chez quatre des cinq espèces de bois échantillonnées, on l'a retrouvé seulement dans 50 billes sur un nombre total de 878 billes échantillonnées (6 %). Comme on ne retrouve pas très fréquemment le champignon, il se peut qu'il ne s'agisse pas du plus compétitif des champignons colorant de l'aubier et on ne peut pas prédire s'il poussera assez bien sur d'autres espèces d'arbres pour leur conférer une protection contre la tache colorée de l'aubier. Par conséquent, les données sur l'efficacité soutiennent la pulvérisation de Sylvanex sur le pin tordu seulement. Sylvanex peut également être utilisé sur le pin rouge étant donné qu'un article publié a démontré son potentiel de croissance sur cette essence forestière, mais des données pour confirmer ce résultat seront nécessaires. Le rapport d'une étude sur le pin rouge menée en 2002 lors de l'octroi d'un permis de recherche doit être soumis afin d'appuyer l'homologation complète de l'utilisation du Sylvanex sur le pin rouge. L'énoncé suivant devra être ajouté sur l'étiquette : « Le Sylvanex s'utilise sur le pin tordu et le pin rouge fraîchement abattus en tant que traitement préventif contre la tache colorée de l'aubier. »

Afin d'être efficace, le Sylvanex doit s'établir sur les billes dès que possible afin d'éviter la colonisation par des champignons de type sauvage colorant l'aubier. Pour ce faire, il est nécessaire de pulvériser un grand nombre de spores par mètre carré. Les doses d'essai ne semblent pas être excessives puisque la dose la plus faible utilisée dans le premier essai n'a pas donné de résultats statistiquement différents des témoins sans traitement. Par conséquent, la dose d'application de l'essai de 540 mL de suspension de 5×10^7 CFU/mL (0,05 UA/L) par mètre carré de surface de bois testé est acceptable. Cependant, la dose proposée sur l'étiquette est exprimée en unités d'activité par tonne de bois au lieu d'en volume de suspension par mètre carré de surface. Comme la quantité de Sylvanex utilisée dépendra de la surface à traiter et non du poids du bois, la dose sur l'étiquette devra être exprimée de la même façon que celle des essais. Il faudra donner sur l'étiquette une garantie spécifique indiquant le nombre actuel de UA de chaque lot afin de calculer la dilution requise pour obtenir une concentration de 0,05 UA/L de suspension de Sylvanex. On ne s'attend pas à ce que le Sylvanex prévienne la croissance des champignons colorant l'aubier une fois que ceux-ci sont installés.

Les documents soumis indiquent qu'un système hydraulique de pulvérisation, attaché à divers équipements d'abattage et d'ébranchage, devra être utilisé pour la pulvérisation aux sites d'abattage. Cette méthode de traitement devrait garantir la couverture complète des billes et s'avère acceptable du point de vue de l'efficacité du produit.

Il faut souligner qu'il n'y a aucune raison de croire que le Sylvanex pourrait effectuer une réversion vers le phénotype coloré, car il a fait l'objet d'études et a été utilisé comme agent de contrôle de la poix depuis bon nombre d'années. Toute instabilité du phénotype aurait depuis été identifiée.

7.2 Phytotoxicité pour les plantes cibles (y compris divers cultivars) ou les produits végétaux cibles (OCDE 7.4)

Cette section n'est pas pertinente, car le Sylvanex est pulvérisé une fois l'arbre coupé.

7.3 Observations d'effets secondaires indésirables ou non voulus

La tache colorée de l'aubier est causée par des champignons pigmentés qui envahissent les cellules du bois et consomment certaines des composantes de l'arbre pour soutenir leur croissance. Même s'il est généralement reconnu que ces champignons colorant l'aubier n'affectent pas les propriétés fonctionnelles du bois, certaines espèces peuvent produire des enzymes qui peuvent endommager le bois. Le demandeur a soumis un rapport sur les effets du Sylvanex et d'autres champignons causant le bleuissement sur la solidité et la résistance à la flexion du pin tordu. Il a aussi soumis une étude publiée sur les effets des champignons causant le bleuissement sur la solidité et le poids du bois. Ces études n'ont pas permis de constater d'effet significatif des champignons causant le bleuissement sur la solidité, la résistance à la flexion et le poids du bois taché ou traité. Par conséquent, l'utilisation du Sylvanex sur du bois fraîchement abattu ne devrait pas causer d'effet nocif à ce bois.

7.4 Aspects économiques

Il n'y a pas eu d'évaluation des aspects économiques. Toutefois, il est généralement reconnu qu'un pourcentage significatif du bois peut être taché par les champignons causant la tache colorée de l'aubier et que le bois taché a une valeur marchande significativement moindre que le bois non taché.

7.5 Pérennité

7.5.1 Recensement des solutions de rechange

7.5.1.1 Méthodes de suppression non chimiques

Le demandeur a indiqué que la suppression des champignons causant le bleuissement se faisait auparavant en arrosant les billes avec de l'eau dont la teneur en oxygène était réduite, ce qui inhibait la colonisation fongique. Cependant, pour ce faire il fallait employer un grand volume d'eau, ce qui soulevait des préoccupations environnementales. Les billes récoltées sont parfois envoyées aux scieries par les rivières ou encore stockées dans des bassins de flottage, ce qui permet aussi d'inhiber la colonisation fongique. Les

arbres peuvent aussi être récoltés en hiver, si cela s'avère possible, lorsque les niveaux d'inoculum fongique et d'activité des insectes sont les plus faibles.

7.5.1.2 Méthodes de suppression chimiques

Il n'existe actuellement aucun produit antiparasitaire homologué pour la suppression des champignons causant la tache colorée de l'aubier sur le bois fraîchement abattu. Les produits antitache colorée de l'aubier présentement homologués peuvent seulement être utilisés sur le bois d'œuvre fraîchement débité.

7.5.2 Compatibilité avec les pratiques actuelles de gestion, y compris la lutte intégrée

Il n'existe actuellement pas de pratiques de lutte intégrée pour la suppression de la tache colorée de l'aubier sur le bois fraîchement abattu, autres que celles décrites à la section 7.5.1.1.

7.5.3 Contribution à la réduction des risques

Il n'existe actuellement aucun produit antiparasitaire homologué pour la suppression de la tache colorée de l'aubier sur le bois fraîchement abattu.

7.5.4 Renseignements sur l'acquisition réelle ou potentielle d'une résistance

Le Sylvanex contient des champignons vivants qui sont appliqués en forte concentration pour limiter le développement de la tache colorée de l'aubier sur le bois fraîchement abattu. Ils agissent en consommant les substances nutritives disponibles dans les billes et en prévenant ainsi l'établissement des champignons de type sauvage colorant l'aubier. Puisque le Sylvanex a un mode d'action compétitif plutôt que toxique envers les souches sauvages de champignons causant la tache colorée de l'aubier, on ne prévoit pas d'acquisition de résistance.

7.6 Conclusions

Les données d'efficacité soumises par le demandeur appuient l'allégation de suppression, par le Sylvanex, des champignons causant le bleuissement et la coloration de l'aubier sur le bois de pin tordu fraîchement abattu. Le demandeur devra soumettre les données de confirmation décrites à la section 9.0 pour appuyer l'homologation complète du produit.

Sommaire de la valeur du produit

Proposition		Recommandation (basée sur l'évaluation de la valeur)	Commentaires
Lieu/ Organisme nuisible	**Détails**		
Tache colorée de l'aubier sur le bois fraîchement abattu	Habituellement utilisé à la dose de 0,05 – 0,1 UA/tonne de bois, ou environ 1×10^{11} CFU par mètre cube de bois. Pulvériser le bois fraîchement abattu au point de chute ou peu après l'entreposage dans le parc à grumes.	Déterminer tout d'abord le volume en litres de suspension de Sylvanex nécessaire en fonction de l'exploitation quotidienne, en multipliant la surface totale en mètre carrés des billes à traiter par 0,54 L. Ensuite, déterminer la quantité de poudre de Sylvanex à ajouter à l'eau, à l'aide de la formule suivante : Nombre de grammes de Sylvanex requis = [Volume, en litres, de suspension de Sylvanex nécessaire aux opérations quotidiennes] × 50 ÷ [garantie de l'étiquette (en UA/kg)] Peser la quantité requise de poudre sèche et réhydrater la poudre en la mélangeant avec de l'eau à 4 – 30 °C et pH 5 – 8. Utiliser un mélangeur pour obtenir un vortex. Prévoir suffisamment de temps pour homogénéiser le mélange avant de l'utiliser. La suspension finale de Sylvanex aura une concentration de 0,05 UA/L ($5,0 \times 10^{10}$ CFU /L). Cette suspension doit être utilisée dans les 24 heures suivant le mélange. La suspension de 0,05 UA/L de Sylvanex doit être pulvérisée sur les billes immédiatement après la récolte du bois et l'ébranchage. Il faut pulvériser la surface entière de chaque bille au taux de 540 mL par mètre carré de surface de bille. Il faut utiliser un système hydraulique de pulvérisation attaché à la machinerie (abatteuse, ébrancheuse), aux sites d'abattage.	a) Utiliser pour lutter contre les champignons causant le bleuissement sur le pin tordu et le pin rouge fraîchement abattus au site d'abattage seulement. NE PAS utiliser sur le bois d'œuvre ou les billes écorcées. b) Le Sylvanex s'utilise sur le pin tordu et le pin rouge fraîchement abattus en tant que traitement préventif contre la tache colorée de l'aubier. c) Il faut utiliser un système hydraulique de pulvérisation, attaché à divers équipements d'abattage et de d'ébranchage, pour le traitement aux sites d'abattage.

8.0 Considérations relatives à la Politique de gestion des substances toxiques

Dans le cadre de l'examen du Sylvanex, l'ARLA a tenu compte de la PGST[1] et a suivi la directive d'homologation DIR99-03[2]. L'Agence a déterminé que ce produit ne satisfait pas les critères de la voie 1 de la PGST, car sa matière active est un organisme biologique et, par conséquent, n'est pas assujettie aux critères utilisés pour définir les propriétés de persistance, de bioaccumulation et de toxicité des produits antiparasitaires chimiques. En outre, la MAQT ne renferme aucun sous-produit ou microcontaminant satisfaisant les critères de la voie 1 de la PGST. Des impuretés d'ordre toxicologique ne devraient pas être présentes dans les matières brutes, ni ne devraient être générées, au cours du processus de fabrication, en quantité suffisante pour présenter un risque pour la santé et la sécurité humaines. D'autre part, il n'y a aucun produit de formulation à la source de préoccupations d'ordre toxicologique présent dans la formulation de la préparation commerciale de Sylvanex.

9.0 Décision réglementaire

L'ARLA a accordé une homologation temporaire à la MAQT, la souche D97 du champignon *Ophiostoma piliferum* (Sylvanex technique) et sa préparation commerciale connexe Sylvanex, en vertu de l'article 17 du RPA, pour utilisation comme produit biologique antitache colorée de l'aubier afin de supprimer les champignons causant le bleuissement sur le bois fraîchement abattu, aux points de chute. Cette homologation est assujettie aux conditions suivantes :

- Soumission d'un nouveau formulaire des spécifications du produit
- Présentation de certificats annuels d'analyse
- Présentation d'un rapport sur les incidents d'hypersensibilité
- Soumission de données additionnelles sur la stabilité à l'entreposage
- Soumission d'une étude de toxicité cutanée
- Soumission de données sur l'efficacité

---

1 Les intéressés peuvent consulter La Politique de gestion des substances toxiques sur le site Web d'Environnement Canada, à l'adresse www.ec.gc.ca/toxics

2 Les intéressés pourront se renseigner sur la directive 99-03, Stratégie de l'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire *Stratégie de l'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire concernant la mise en oeuvre de la politique de gestion des substances toxiques*, en s'adressant au Service de renseignements sur la lutte antiparasitaire. En voici les coordonnées : téléphone au Canada 1 800 267-6315; téléphone à l'extérieur du Canada 1 (613) 736-3799 (avec frais d'interurbain); télécopieur (613) 736-3798; courriel pmra_infoserv@hc-sc.gc.ca. On peut également passer par le site Web de l'ARLA à www.hc-sc.gc.ca/pmra-arla

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
AMLA	agent microbien de lutte antiparasitaire
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ANOVA	analyse de variance
ARLA	Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire
Btk	*Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*
°C	degré Celcius
cm	centimètre(s)
CFU	cellule souche unipotente
CL_{50}	concentration létale à 50 %
CMM	cote moyenne maximale
DL_{50}	dose létale à 50 %
DMENO	dose minimale entraînant un effet nocif observé
DSENO	dose sans effet nocif observé
DSEO	dose sans effet observé
EPA	United States Environmental Protection Agency
EPI	équipement de protection individuelle
FDA	Food and Drugs Administration
g	gramme(s)
h	heure(s)
IMI	indice maximum d'irritation
kg	kilogramme(s)
L	litre(s)
LMR	limite maximale de résidus
m^3	mètre(s) cube(s)
MAQT	matière active de qualité technique
mg	milligramme(s)
mL	millilitre(s)
mm	millimètre(s)
NRRL	Northern Regional Research Laboratory
NZB	Néo-zélandais blanc
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
PC	préparation commerciale
PDA	gélose dextrosée à la pomme de terre
PGST	Politique de gestion des substances toxiques
pH	potentiel d'hydrogène
p/p	rapport poids/poids
ppm	partie(s) par million
PRDD	Projet de décision d'homologation
RFLP	polymorphisme de restriction
RPA	Règlement sur les produits antiparasitaires

UA	unités actives
µg	microgramme(s)
µL	microlitre(s)
USDA	United States Department of Agriculture
v/v	rapport volume/volume

Annexe I Toxicologie

Tableau 1 Sommaire des études de toxicité et d'infectiosité avec la souche C-1 det 5 d'*Ophiostoma piliferum*

ÉTUDE	ESPÈCE/SOUCHE ET DOSES	DL_{50} DSEO/DSENO ET DMENO	ORGANE CIBLE/EFFETS IMPORTANTS/COMMENTAIRES
ÉTUDES DE TOXICITÉ AIGUË			
Toxicité/ pathogénicité par voie orale	Rat — Crl: $CD^{®}$ (SD) BR VAF PLUS 15/sexe traités avec la souche vivante C-1 det 5, 2 mL/kg p.c., ou ~ 10^{9} CFU/kg p.c. 5/sexe traités avec la souche C-1 det 5 tuée par la chaleur, 2 mL/kg p.c.	DL_{50} supérieure à 10^{9} CFU/kg p.c.	Pas de signe clinique indiquant une toxicité ou une pathogénicité, pas de mortalité, pas d'anomalie relevée à la nécropsie, aucune récupération d'*Ophiostoma piliferum* dans les tissus (cerveau, coeur, foie, poumons, rate, reins, ganglions mésentériques), dans le contenu du tractus gastro-intestinal (estomac, petit intestin ou caecum), dans l'urine ou les excréments, sur une gélose de Sabouraud au dextrose[1]. FAIBLE TOXICITÉ, NON PATHOGÈNE
Toxicité/ pathogénicité pulmonaire	Rat — Crl: $CD^{®}$ (SD) BR VAF PLUS 18/sexe traités avec la souche vivante C-1 det 5, 1,2 mL/kg p.c., ou ~ 10^{9} CFU/kg p.c. 5/sexe traités avec la souche C-1 det 5 tuée par la chaleur, 1,2 mL/kg p.c.	DL_{50} supérieure à 10^{9} CFU/kg p.c.	Pas de signe clinique indiquant une toxicité ou une pathogénicité, pas de mortalité, pas d'anomalie relevée à la nécropsie. Récupération passagère d'*Ophiostoma piliferum* dans les poumons (terminée au jour 4). Pas de récupération d'*Ophiostoma piliferum* dans les autres tissus (cerveau, coeur, foie, rate, reins, ganglions mésentériques), dans le contenu du tractus gastro intestinal (estomac, petit intestin ou caecum), dans l'urine ou les excréments, sur une gélose de Sabouraud au dextrose[1]. FAIBLE TOXICITÉ, NON PATHOGÈNE
Toxicité cutanée	Lapin — NZB 5/sexe traités avec 2 mL de souche vivante C-1 det 5 ($2,3 \times 10^{9}$ CFU) sur une surface de 10 cm^2 dans le dos, recouverte d'un pansement pendant 24 heures et lavée ensuite	DL_{50} supérieure à 8×10^{8} CFU/kg p.c.	Aucune mortalité. Pas de signe d'irritation cutanée (voir plus bas). Il n'a pas été possible de tirer des conclusions définitives, car la dose administrée était trop faible. Noter que l'essai a eu lieu avec une suspension de la souche C-1 det 5 d'*Ophiostoma piliferum* et non avec la PC. Cela s'avère acceptable, car aucun ingrédient additionnel n'est incorporé dans la formulation de la PC et les deux souches sont équivalentes biologiquement. DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES
Irritation cutanée	Lapin — NZB Voir l'étude de toxicité cutanée ci-dessus.	IMI[2] 0/8 (à tous les temps) CMM[3] 0/8 (24, 48, 72 h)	Pas de signe d'irritation cutanée NON-IRRITANT

ÉTUDE	ESPÈCE/SOUCHE ET DOSES	DL_{50} DSEO/DSENO ET DMENO	ORGANE CIBLE/EFFETS IMPORTANTS/COMMENTAIRES
Irritation oculaire	Lapin — NZB 3/sexe traités avec 0,1 mL souche vivante C-1 det 5 ($1,15 \times 10^8$ CFU)	IMI[2] 4,67/110 (1 h) CMM[3] 1,11/110 (24, 48, 72 h)	Aucun dommage observé à la cornée ou à l'iris. Rougeur de la conjonctive résolue au jour 4. Noter que la substance à l'essai était la MAQT et non la PC. Bien qu'aucun ingrédient additionnel ne soit incorporé pendant la formulation de la PC, en tant que poudre, la PC est potentiellement abrasive et par conséquent, irritante pour les yeux. DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES

1 Bien que l'on n'ait pas évalué de façon indépendante la sensibilité de la détection de *Ophiostoma piliferum* sur une gélose de Sabouraud au dextrose, le même milieu de culture a été utilisé de façon efficace pour la titration de l'inoculum et l'on a signalé la récupération d'*Ophiostoma piliferum* dans les poumons dans le cadre de l'étude sur la toxicité pulmonaire aiguë.

2 IMI = indice maximum d'irritation

3 CMM = cote moyenne maximale

Annexe II Évaluation environnementale

Tableau 1 Risques de la souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* pour les organismes terrestres non visés

Organisme	Exposition	Substance à l'essai	Conclusions
Arthropodes	Aiguë	Justification d'exemption soumise au lieu de données	L'ARLA **A ACCEPTÉ** la justification d'exemption soumise par le demandeur, compte tenu du potentiel limité de risque.
Oiseaux	Orale/ pulmonaire/ inhalation/ injection	Justification d'exemption soumise au lieu de données	L'ARLA **A ACCEPTÉ** la justification d'exemption soumise par le demandeur, compte tenu du potentiel limité de risque.
Mammifères sauvages	Aiguë	Non requis	Compte tenu de l'absence d'effet nocif significatif dont fait état la documentation publiée et les études toxicologiques décrites à la section 3, cette exigence n'a pas été formulée.

Organisme	Exposition	Substance à l'essai	Conclusions
Plantes	Aiguë — *Pinus resinosa* *Pinus banksiana* *Pinus sylvestris* *Pinus taeda* *Pinus elliottii* *Pinus palustris*	Souche D97 d'*Ophiostoma piliferum*	Étude : Aucun des arbres endommagés n'est mort pendant la période d'étude et toutes les blessures s'étaient refermées à l'exception celles de deux arbres. Chez *P. taeda*, 1/10 des blessures traitées avec la souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* et 1/10 des blessures traitées avec la souche sauvage d'*Ophiostoma piliferum* avaient du cal de cicatrisation mais l'exsudat de poix avait empêché la fermeture complète de la blessure. D'après ces résultats, la souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* souche D97 n'est pas pathogène pour les six espèces de pin. L'ARLA juge cette étude de pathogénicité acceptable, mais celle-ci ne satisfait pas complètement ses exigences en ce qui concerne l'étude de toxicité/pathogénicité chez les organismes terrestres, car il n'y a pas eu d'observations adéquates permettant d'évaluer la toxicité sublétale (p. ex., croissance, vigueur). Justification d'exemption : L'ARLA **A ACCEPTÉ** la justification d'exemption soumise par le demandeur, compte tenu du potentiel limité de risque
	Aiguë	Justification d'exemption soumise au lieu de données	
Microorganismes du sol	Aiguë	Non requis	Cette exigence en matière de soumission de données n'a pas été formulée.
Invertébrés non arthropodes	Aiguë	Non requis	Cette exigence en matière de soumission de données n'a pas été formulée.

Tableau 2 Risques de la souche D97 d'*Ophiostoma piliferum* pour les organismes aquatiques non visés

Organisme	Exposition	Substance à l'essai	Conclusions
Arthropodes d'eau douce	Aiguë — *Daphnia magna*	Cartapip 58 1000 mg/L (Nominal)	Étude sur *Daphnia magna* : Aucun effet nocif observé sur les daphnies pendant toute la durée de l'étude. La CL_{50} était supérieure à 1000 mg/L. L'ARLA juge cette étude acceptable, mais celle-ci ne satisfait pas complètement ses exigences en ce qui concerne l'étude de toxicité/pathogénicité chez les arthropodes; il n'a pas été possible de tirer des conclusions définitives en ce qui a trait au potentiel d'infectiosité et de pathogénicité de l'AMLA.
	Aiguë — *Ceriodaphnia dubia*	Effluent provenant de copeaux de bois traités avec le Cartapip à 100, 50, 25, 12,5, 6,2 et 0 %	Étude sur *Ceriodaphnia dubia* : Après 24 heures, 5 daphnies sur 20 étaient mortes dans le groupe exposé à 100 % de l'effluent provenant de copeaux de bois traité. Après 48 heures, une daphnie (1/20) était morte dans chacun des groupes exposés à 50 % et 100 % de l'effluent provenant de copeaux de bois non traités et 6 daphnies sur 20 étaient mortes dans le groupe exposé à 100 % de l'effluent provenant des copeaux de bois traités avec du Cartapip 58. L'ARLA juge cette étude acceptable, mais celle-ci ne satisfait pas complètement ses exigences en ce qui concerne l'étude de toxicité/pathogénicité chez les arthropodes aquatiques, car la substance à l'essai n'était ni la MAQT ni la PC et il n'a pas été possible de tirer des conclusions définitives en ce qui a trait au potentiel d'infectiosité et de pathogénicité de l'AMLA. Aucune étude de remplacement n'est requise compte tenu des propriétés biologiques d'*Ophiostoma piliferum* et de l'absence d'effet nocif dont fait état la documentation publiée.

Organisme	Exposition	Substance à l'essai	Conclusions
Poissons d'eau douce	Aiguë	Cartapip 58 1000 mg/L (nominal)	Aucun effet nocif observé sur aucun des poisson pendant toute la durée de l'étude. La CL_{50} était supérieure à 1000 mg/L. L'ARLA juge l'étude de toxicité sur la truite arc-en-ciel acceptable, mais celle-ci ne satisfait pas complètement ses exigences en ce qui concerne l'étude de toxicité/pathogénicité chez un poisson d'eau douce et il n'a pas été possible de tirer des conclusions définitives en ce qui a trait au potentiel d'infectiosité et de pathogénicité de l'AMLA. Aucune étude de remplacement n'est requise compte tenu des propriétés biologiques d'*Ophiostoma piliferum* et de l'absence d'effet nocif dont fait état la documentation publiée.
Plantes d'eau douce	Aiguë	Justification d'exemption soumise au lieu de données	L'ARLA **A ACCEPTÉ** la justification d'exemption soumise par le demandeur, compte tenu du potentiel limité de risque.
Arthropodes marins et estuariens	Aiguë	Justification d'exemption soumise au lieu de données	L'ARLA **A ACCEPTÉ** la justification d'exemption soumise par le demandeur, compte tenu du potentiel limité de risque.
Poissons marins et estuariens	Aiguë	Justification d'exemption soumise au lieu de données	L'ARLA **A ACCEPTÉ** la justification d'exemption soumise par le demandeur, compte tenu du potentiel limité de risque.

Références

Harrington, T. C. « Cycloheximide sensitivity as a taxonomic character in *Ceratocystis*. » dans *Mycologia*, 1981, vol. 73, p.1123 – 1129.

Hunt, J. « Taxonomy of the genus *Ceratocystis*. », dans *Lloydia*, 1956, vol. 19, n° 1, p. 1 – 30.

Uzunovic, A., D.-Q. Yang, P. Gagné, C. Breuil, L. Bernier, A. Byrne, M. Gignac et S. H. Kim. « Fungi that cause sapstain in Canadian softwoods. » dans *Canadian Journal of Microbiology*, 1999, vol. 45, p. 914 – 922.

Verrall, A. F. « Relative importance and seasonal prevalence of wood-staining fungi in the southern states. » dans *Phytopathology*, 1939, vol. 29, p.1031 – 1051.